

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Kateřina Svobodová

CHEMILUMINISCENČNÍ STANOVENÍ VITAMINU B₁₂
POMOCÍ PRŮTOKOVÝCH TECHNIK ANALÝZY

Determination of vitamin B₁₂ by flow analysis with chemiluminiscent
detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 8. 3. 2013

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D., za odborné vedení, pomoc a rady, které mi po dobu řešení mé diplomové práce poskytoval.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením vitamínu B₁₂ pomocí průtokových technik analýzy. Stanovení je založeno na reakci luminol-peroxid vodíku. Kobaltnatý iont (Co²⁺), přítomný ve struktuře vitamínu B₁₂, v reakci vystupuje jako katalyzátor. V experimentální části byly vypracovány metody stanovení iontu Co²⁺ technikami průtokové analýzy, a to průtokovou injekční analýzou (FIA) a sekvenční injekční analýzou (SIA). Následně bylo přistoupeno k samotným rozkladům vitamínu B₁₂ vedoucí k uvolnění iontu Co²⁺ z jeho molekuly. K tomu je možné využít různých typů rozkladů, které jsou zmíněny v této práci. Nejvyšší účinnosti bylo dosaženo rozkladem vitamínu B₁₂ s K₂S₂O₈ o koncentraci 1,5 mmol.l⁻¹ a dobou ozařování 1 minuta. Účinnost rozkladu dosáhla hodnoty 74,43 %. Při FIA uspořádání byl zjištěn lineární rozsah do 500 mg.l⁻¹, relativní směrodatná odchylka (RSD) 2,59% (n = 10) a limit detekce (LOD) 55 µg.l⁻¹. Optimální objem vzorku potřebného k analýze byl 60 µl. Doba jedné analýzy činila 140 s. Získané výsledky ze SIA uspořádání byly následující: lineární dynamický rozsah do 50 mg.l⁻¹, RSD = 4,5% (n= 10) a LOD = 25 µg.l⁻¹. Optimální objem vzorku potřebného k analýze byl 250 µl. Doba jedné analýzy činila 80,1 s. Interferenční studie ukázala, že z celé řady iontů ovlivňující stanovení byly vybrány pouze ionty Ni²⁺, Zn²⁺ a NO₂⁻, které již od koncentrace 50 mg.l⁻¹ významně ovlivňují stanovení Co²⁺ v roztoku. Intenzitu chemiluminiscence nejvíce potlačují ionty Zn²⁺. V roztoku o koncentraci iontů Co²⁺ a Zn²⁺ v poměru 1:25 byla potlačena intenzita chemiluminiscence až o 93,1 %.

Klíčová slova:

Průtoková injekční analýza

Sekvenční injekční analýza

Chemiluminiscence

Luminol

Vitamin B₁₂ (kyanokobalamin)

Spektrofotometrie

ABSTRACT

This thesis reports determination of vitamin B₁₂ by flow techniques of analysis. This method is based on luminol-peroxide chemiluminiscence assay for the detection of cobalt (II) ions in vitamin B₁₂ molecules. The method includes releasing of Co²⁺ from the vitamin B₁₂ using different types of its decomposition; these are mentioned in this thesis. The efficiency of the decomposition of real samples of vitamin B₁₂ in this study reached 74.43 %. The high efficiency was achieved with 1.5 mmol.l⁻¹ K₂S₂O₈ and irradiation time 1 minute. In the FIA mode, the linear range obtained was between 1.0 to 500 mg.l⁻¹ with a relative standard deviation (RSD) 2.59% (n = 10), limit of detection (LOD) 55 µg.l⁻¹. The minimum sample volume required and the time of analysis were 60 µl and 140.2 s. In the SIA mode, the linear range obtained was between 0.01 to 50 mg.l⁻¹ with an RSD = 4.5% (n = 10), LOD = 25 µg.l⁻¹. The minimum sample volume required and the time of analysis were 250 µl and 80.1 s. Interference study showed that from wide range of interfering ions were selected only Ni²⁺, Zn²⁺ and NO₂⁻, that from concentration level 50 mg.l⁻¹ they significantly affect the determination of the Co²⁺ in solution. The intensity of chemiluminiscence most suppress ion Zn²⁺. The solution with the concentration ratio of Co²⁺ and Zn²⁺ (1:25) inhibited chemiluminiscence intensity up to 93.1%.

Keywords

Flow injection analysis

Sequential injection analysis

Chemiluminiscence

Luminol

Vitamin B₁₂ (cobalamin)

Spectrophotometry

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAS	atomová absorpční spektrometrie (Atomic absorption spectrometry)
Biosens-SPR	biosenzor založen na povrchové plasmonové rezonanci (Biosensor assay based on surface plasmon resonance)
$C_{(Co^{2+})}$	koncentrace roztoku kobaltu
$C_{(interf)}$	koncentrace roztoku interferujícího iontu
$C_{(lum)}$	koncentrace luminolu
CE-ICP-MS	kapilární elektroforéza s indukčně vázaným plazmatem s hmotnostním analyzátozem (Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	imunoenzymatické reakce (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ESIMS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (Electrospray ionization-mass spectrometry)
FIA	průtoková injekční analýza (Flow injection analysis)
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza (High performance capillary electrophoresis)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
ICP-MS	hmotností spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively coupled plasma-mass spectrometry)
LOD	limit detekce (Limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (Limit of quantitation)
Lum	luminol
MBA	mikrobiologická analýza (Microbiological assay)
MM-HPLC	multimode-HPLC

MSC	multisyring chromatografie (Multisyring chromatography)
MSCE	multisyring kapilární elektroforézu (Multisyring capillary electrophoresis)
MSFIA	multisyring injekční analýza (Multisyring flow injection analysis)
RIA	radioizotopová analýza (Radioisotopic assay)
RSD	relativní směrodatná odchylka (Relative standard deviation)
SFA	segmentová průtoková analýza (Segmented flow analysis)
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential injection analysis)
SIC	sekvenční injekční chromatografie (Sequential injection chromatography)
t_{intg}	integrační čas
UV	ultrafialové záření (Ultraviolet)
$V_{(\text{Co}^{2+})}$	objem roztoku kobaltu
$v_{(\text{Co}^{2+})}$	průtoková rychlost kobaltu
$V_{(\text{H}_2\text{O})}$	průtoková rychlost vody
$v_{(\text{H}_2\text{O}_2)}$	průtoková rychlost peroxidu vodíku
$V_{(\text{interf.} + \text{Co}^{2+})}$	objem směsi obsahující interferent a ionty Co^{2+}
$v_{(\text{lum})}$	průtoková rychlost luminolu
$V_{(\text{lum} + \text{vzorek})}$	objem směsi luminol a vzorek
$V_{(\text{interf} + \text{Co}^{2+})}$	objem směsi roztoku interferentu a Co^{2+}
$v_{(\text{vz} + \text{lum})}$	průtoková rychlost směsi vzorek a luminol

OBSAH

1. CÍL PRÁCE.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1. Průtokové metody	11
2.2. FIA	12
2.3. SIA	13
2.4. Vitamin B ₁₂ , jeho charakteristiky a stanovení.....	15
2.4.1. Historie objevu vitaminu B ₁₂	15
2.4.2. Chemická struktura a stabilita	16
2.4.3. Zdroje a stálost	17
2.4.4. Transport a funkce.....	18
2.4.5. Toxicita a deficience	18
2.4.6. Metody stanovení kobalaminu	19
2.5. Luminiscence	20
2.6. Luminol	22
2.7. Možnosti rozkladu vitaminu B ₁₂	24
2.7.1. Acidifikace vitaminu B ₁₂ pomocí 0,1 M HCl.....	24
2.7.2. Přídavek oxidačního činidla a následné UV ozáření.....	24
2.7.3. Acidifikace pomocí HNO ₃ a následné vypaření.....	24
2.7.4. Rozklad na mokré cestě.....	25
2.8. Interference	25
2.9. Statistické zpracování výsledků	26
2.9.1. Aritmetický průměr	26
2.9.2. Medián.....	26
2.9.3. Směrodatná odchylka	26
2.9.4. Opakovatelnost.....	27
2.9.5. Relativní směrodatná odchylka	27
2.9.6. Mez detekce a mez stanovitelnosti	27
2.9.7. Dixonův Q – test	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29

3.1.	Přístrojové vybavení a instrumentace.....	29
3.2.	Použité chemikálie	29
3.3.	Příprava roztoků	30
3.4.	Aparatura použitá pro FIA stanovení	31
3.5.	Aparatura použitá pro SIA stanovení	32
4.	VÝSLEDKY MĚŘENÍ	34
4.1.	Složení reakční směsi	34
4.1.1.	Postup přípravy reakčního roztoku.....	35
4.2.	Stanovení Co^{2+} pomocí FIA techniky	37
4.2.1.	Optimalizace koncentrací roztoků H_2O_2 a luminolu	38
4.2.2.	Optimalizace průtokových rychlostí roztoku Co^{2+} a luminolu.....	39
4.2.3.	Optimalizace pH reakčního roztoku.....	41
4.2.4.	Optimalizace dávkovaného objemu vzorku	42
4.2.5.	Kalibrační závislost stanovení Co^{2+} technikou FIA	43
4.3.	Stanovení Co^{2+} pomocí SIA techniky.....	45
4.3.1.	Optimalizace průtoku H_2O_2	46
4.3.2.	Optimalizace průtoku směsi luminol + Co^{2+}	48
4.3.3.	Optimalizace objemů reagentů.....	49
4.3.4.	Optimalizace zadržovacího času	50
4.3.5.	Kalibrační závislost.....	51
4.4.	Rozklad a stanovení vitamínu B_{12}	52
4.4.1.	Rozklad na mokré cestě.....	53
4.4.2.	Rozklad s $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a UV zářením.....	54
4.4.3.	Rozklad s HNO_3	55
4.4.4.	Rozklad s HCl	55
4.5.	Studium interferencí.....	56
5.	ZÁVĚR.....	59
6.	BIBLIOGRAFIE	61

1. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodu stanovení vitamínu B₁₂ reakcí s luminolem a peroxidem vodíku v průtokovém uspořádání technikami průtokové injekční analýzy (FIA) a sekvenční injekční analýzy (SIA) a porovnat dosažené výsledky stanovení pro obě techniky. Stanovení vitamínu B₁₂ bylo založeno na detekci chemiluminiscenčního záření uvolněného během reakce luminolu s peroxidem vodíku (H₂O₂) katalyzované kobaltnatým iontem (Co²⁺), který byl získán rozkladem vitamínu. Dílčími cíli bylo v průběhu práce nalezení optimálních podmínek pro stanovení vitamínu pomocí techniky FIA, zjištění základních charakteristik metody stanovení vitamínu B₁₂ ve FIA uspořádání, nalezení optimálních podmínek pro stanovení vitamínu pomocí techniky SIA, zjištění základních charakteristik metody stanovení vitamínu B₁₂ v SIA uspořádání, nalezení účinného způsobu rozkladu vitamínu B₁₂, aplikace vypracovaných průtokových metod na stanovení vitamínu B₁₂ v léčivech a potravinových doplncích a provedení interferenční studie.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Průtokové metody

Novodobá chemie klade velmi vysoké nároky na nově se vyvíjející analytické metody. Důraz je kladen na citlivost, selektivitu, spotřebu reakčních činidel a vzorku. Nesmí se opomenout také šetrnost k životnímu prostředí. Průtokové metody jsou řazeny do skupiny instrumentálních technik v analytické chemii, kde analyt obsažený ve vzorku reaguje s vhodným reakčním činidlem v proudu nosné kapaliny. Ta zajišťuje promísení reakčních zón a transport produktů do detekčního systému, kterým je v případě průtokových metod průtoková cela spojená s UV-VIS spektrofotometrem či fluorimetrem. Proud nosné kapaliny je zajišťován peristaltickým či pístovým čerpadlem. Signál detekčního systému nabývá tvar píku.

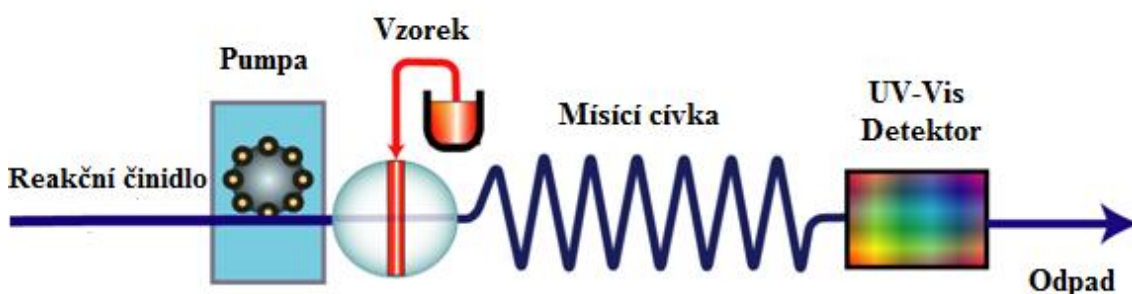
Průtokové metody umožňují stanovení velkého množství vzorků v krátkém čase. Miniaturizací systémů se snižuje spotřeba reakčních činidel a vzorků na minimum. Množství vzniklého odpadu klesá, z čehož plyne šetrnost k životnímu prostředí. V případě drahých reagensů vedou k vyšší rentabilitě. Snižuje se také kontakt pracovníků laboratoře s chemickými, v některých případech i toxickými látkami. Nesmírnou výhodou průtokových metod je stanovení analytu bez jakékoli předchozí úpravy vzorku.

Vývoj průtokových metod a jejich automatizace odstartoval ve chvíli, kdy se začala zvyšovat poptávka po analýzách velkého množství vzorků pocházejících z různých typů matric. Prvním průtokovým systémem byla segmentovaná průtoková analýza (SFA) či FIA, které byly ovládány ručně. Rozvoj počítačů umožnil vyvinout automatizované techniky jako je SIA nebo multisyringe injekční analýza (MSFIA). To přineslo mnoho výhod, například snížení potřebného objemu vzorku a reakčních činidel k analýze, čištění vzorku a jeho zakoncentrování, odstranění plynů či jeho fotooxidaci. Spojení výše uvedených technik se separačními metodami nám otevřelo nové možnosti v předkolonové či pokolonové úpravě vzorku za současného využití výhod separačních metod. Patří zde například: Lab-On-Valve HPLC (LOV-HPLC), sekvenční injekční chromatografie (SIC), multisyring chromatografie (MSC) a také multisyring kapilární elektroforéza (MSCE)⁽¹⁾.

Průtokové metody nachází široké uplatnění v potravinářských, environmentálních, klinických a farmaceutických analýzách ⁽²⁾.

2.2. FIA

Technika FIA byla navržena v roce 1975 J. Růžičkou a E. Hansenem ⁽³⁾. Princip metody je založen na přesném dávkování objemu vzorku do kontinuálního proudu nosné kapaliny. Nosná kapalina může být činidlo, pufr či voda. Tok kapaliny je zajišťován peristaltickou pumpou. Nadávkovaná zóna vzorku je v nosné kapalině rozmývána. Pokud je nosnou kapalinou reakční činidlo, dochází ke vzniku reakčních produktů. Ty jsou následně vedeny do průtokové cely detektoru. Následně vše putuje do odpadu. Obecné schéma aparatury pro průtokovou injekční analýzu je znázorněno na obr. 2.1. Analytickým signálem jsou píky, jejichž výška odpovídá množství analytu ve vzorku. Pokud je potřeba k reakci více reakčních činidel, je možné do hlavního toku kapaliny přidávat další kanálky reagentů ⁽⁴⁾. V klasickém FIA uspořádání byl vzorek dávkován ručně injekční stříkačkou. Dnes je již využíváno automatického dávkování pomocí otočných dávkovacích ventilů ⁽⁵⁾.



Obr. 2.1.: Schéma aparatury pro průtokovou injekční analýzu ⁽⁶⁾

Výhodou FIA uspořádání je, že již mezi jednotlivými zónami nedochází ke vzduchovému segmentování tak, jak je tomu u SFA. Došlo tak ke snížení dávkovaného objemu vzorků a zvýšil se počet dosažených analýz za jednotku času. Hadičky, které přivádí reagenty, mají menší průměr. To má za následek vznik laminárního proudění a také do jisté míry snižují spotřebu reakčních činidel. Nevýhodou FIA technik je

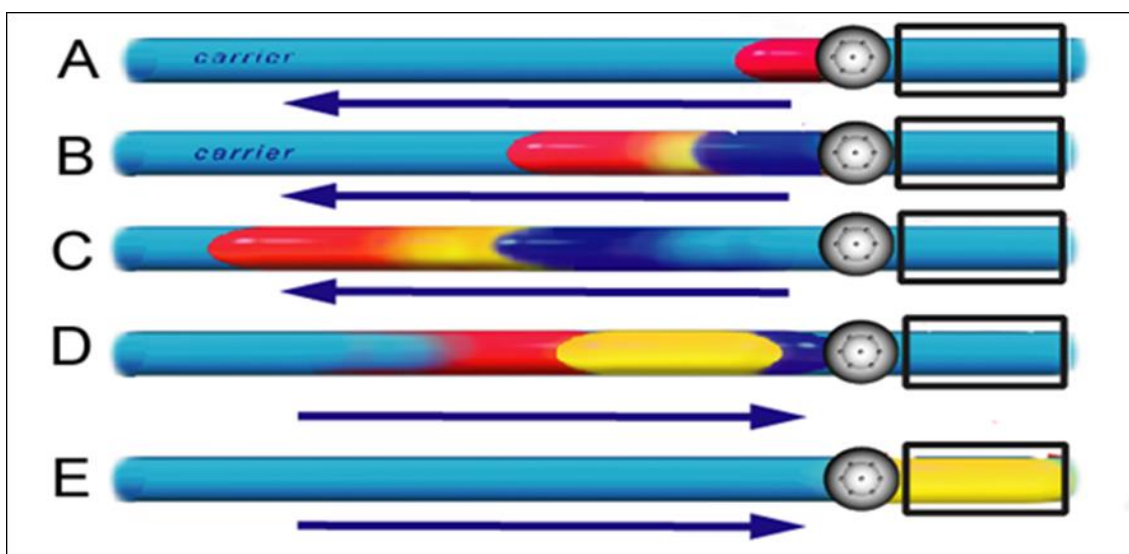
používání peristaltických pump, které způsobují pulsaci toku a deformaci tygonových hadiček, což má za následek změny průtokových parametrů. Další nevýhodou je čerpání agresivních reakčních činidel, které tyto hadičky poškozují ⁽⁷⁾.

Pro svou jednoduchost, spolehlivost, robustnost a reprodukovatelnost se FIA stala velmi účinnou instrumentální metodou pro široké spektrum analytických aplikací ⁽⁸⁾.

2.3. SIA

Sekvenční injekční analýza byla vyvinuta na začátku devadesátých let v důsledku odstraňování nedostatků FIA ^{(9), (10)}. Za jejím zrodem stál opět J. Růžička z Washingtonské univerzity. Praxí se ukázalo, že SIA technika nabízí veliké množství variant využití, které přináší řadu výhod ale i nevýhod ⁽⁵⁾.

Hlavním rozdílem mezi FIA a SIA technikou je geometrie nosného toku. Průtoková injekční analýza využívá přímý kontinuální tok, zatímco sekvenční injekční analýza využívá kombinaci (přímého/zpětného) toku nosné kapaliny, který je řízen počítačem ^{(11), (12)}.

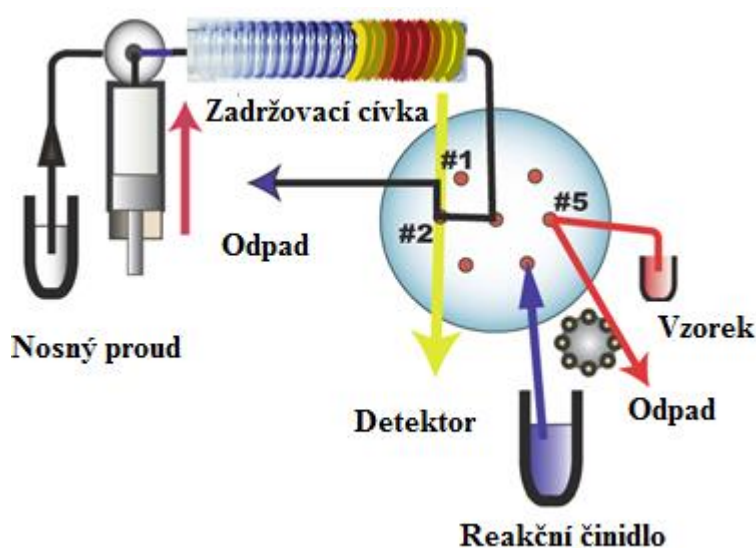


Obr. 2.2: Princip změny toku při sekvenční injekční analýze ⁽⁶⁾

V základním uspořádání se k nadávkování jednotlivých zón využívá vícecestný selekční ventil. Proud nosné kapaliny je realizován pístovým čerpadlem s injekční stříkačkou. Působením toku dochází k rozmývání jednotlivých zón a na jejich

rozhraní dochází ke vzniku reakčních produktů. Následně dochází k obrácení nosného toku, což výrazně přispívá k promíchání jednotlivých zón. Produkt reakce je poté dopraven do průtokové cely, kde celý proces analýzy končí. Díky tomu, že veškeré procesy jsou počítačově řízené, je analýza dokonale reprodukovatelná a všechny vzorky jsou zpracovány stejným způsobem ⁽⁶⁾. V obr. 2.2 jsou popsány jednotlivé kroky analýzy. Krok A popisuje dávkování přesného objemu analytu (červená zóna) do zadržovací cívky pomocí vícecestného selekčního ventilu. Následuje krok B, kdy dochází k nasátí objemu reakčního činidla (modrá zóna). V kroku C dochází k mísení jednotlivých zón, což má za následek vznik produktů (žlutá zóna). Vytvořením zpětného toku se zóny budou nadále mísit (D). Nakonec (E) reakční produkty putují do průtokové cely, kde jsou snímány detektorem.

Základní schéma SIA aparatury je znázorněno na obr. 2.3. Skládá se z jednokanálového dvousměrného pístového čerpadla s injekční stříkačkou, vícecestného selekčního ventilu (nejčastěji 6, 8, 10 cest), propojovací teflonové kapiláry, zadržovací či reakční cívky, detektoru s průtokovou detekční celou a řídicím počítačem ⁽¹¹⁾.



Obr. 2.3.: Schéma aparatury pro sekvenční injekční analýzu ⁽⁶⁾

Volba detektorů záleží pouze na typu chemické reakce použité ke stanovení daného analytu. Nejčastěji bývají využívány detektory spektrofotometrické ⁽¹³⁾,

spektrofluorimetrické⁽¹⁴⁾ a elektrochemické⁽¹⁵⁾. Výsledný signál má stejně jako u FIA tvar píku⁽¹¹⁾.

U obou technik jsou průtokové rychlosti velmi podobné. Pohybují se v řádech jednotek $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Objem vzorku lze u SIA techniky mezi analýzami měnit, zatímco u FIA je dávkovaný objem pro celou sérii analýz neměnný⁽¹¹⁾.

Nevýhodou SIA techniky je menší počet analýz za jednotku času a vyšší nároky na počítačovou techniku a vybavení⁽¹⁶⁾. Mezi výhody patří robustnost, spolehlivost a jednokanálové uspořádání průtokového systému. Spotřeba reakčních činidel a vzorků je díky změnám směru toku menší než u FIA techniky, kde je čerpání reakčních činidel kontinuální⁽¹¹⁾. Další výhodou je počítačové ovládání, kterým je možné měnit konfiguraci stanovení, aniž by se muselo fyzicky měnit uspořádání SIA systému⁽⁶⁾.

Metoda SIA našla uplatnění v průmyslových, environmentálních, imunologických, biologických, potravinářských a farmaceutických analýzách. V roce 2002 bylo publikováno až 300 prací, v roce 2005 až 100 prací využívajících SIA analýzu v potravinářském odvětví^{(17), (18)}. Review z roku 2006 dokládá více než 150 prací zabývajících se SIA analýzami ve farmaceutickém odvětví⁽¹⁹⁾. SIA metoda byla také využita k analýze vod⁽¹⁴⁾ či použita jako nástroj k on-line předúpravě vzorků⁽²⁰⁾.

2.4. Vitamin B₁₂, jeho charakteristiky a stanovení

2.4.1. Historie objevu vitamínu B₁₂

Jeho objevení je úzce spjato s nemocí nazývanou perniciozní anémie, která patřila mezi smrtelné a nevyléčitelné choroby. V roce 1926 vědci George Minot a William Murphy přišli s objevem léku. Léčba byla prostá. Stačilo pouze podávat syrová játra. Zařazení jater do jídelníčku pacientů způsobovalo novotvorbu erytrocytů a tím i zlepšení jejich stavu. Objev léku byl odměněn Nobelovou cenou. Až po dvou desetiletích byla z jater extrahována sloučenina, která dostala název vitamin B₁₂ – kobalamin^{(21), (22)}. Látky s obdobným účinkem začaly být řazeny do skupiny kobalaminů. Jeho struktura byla popsána Dorothy Hodgkin. První syntézu provedl v roce 1965 Robert Woodward^{(23), (22)}.

2.4.2. Chemická struktura a stabilita

Vitamin B₁₂ nazývaný jako kobalamin je molekula, jejímž základem je korinový kruh. V centru tohoto komplexu je vázán dvojmocný kobalt ⁽²⁴⁾. Korinový kruh je tvořen čtyřmi vázanými pyrrolovými kruhy. Podobnou strukturu je možné nalézt u hemových barviv či chlorofylu. Ve struktuře kobalaminu je vázán velký počet substituentů, zejména se jedná o methylové zbytky (na pyrrolových jádrech a v polohách 5 a 15) a acetamidové skupiny (propionamidové zbytky v počtu čtyř v α poloze, dále po třech acetamidech v β poloze) ⁽²⁵⁾. Kobalt je schopen vázat až 6 ligandů pomocí koordinačních vazeb. Čtyři vazby jsou obsazeny dusíky pyrrolových kruhů. Pátá vazba patří druhému atomu dusíku 5,6-dimethylbenzimidazolu (v α poloze), ale nemusí být v komplexu obsazena. Jestliže struktura obsahuje jinou bázi (např. purinovou či pyrimidinovou), je nazýván kobalamin analogem vitaminu B₁₂. Šestá vazba může zůstat volná nebo se na ni váží různé funkční skupiny. Dle typu navázané funkční skupiny dělíme kobalaminy:

- **adenosylkobalamin (1) a methylkobalamin (2)**

Aktivní formy vitaminu jsou velmi málo stabilní, proto nejsou využívány ve vitaminových doplňcích stravy. Podle názvu jsou snadno rozeznány. Adenosylkobalaminu je ligandem 5'-deoxyadenosyl a u methylkobalaminu methyl.

- **hydroxykobalamin (2)**

Ligandem je hydroxylová skupina.

- **kyanokobalamin (5)**

Je velmi stabilní a snadno se přeměňuje na aktivní formy vitaminu. Proto je hojně využíván v potravinových doplňcích. Vzniká převážně synteticky. Ligandem je kyanidový aniont.

- **akvakobalamin**

Ligandem je voda.

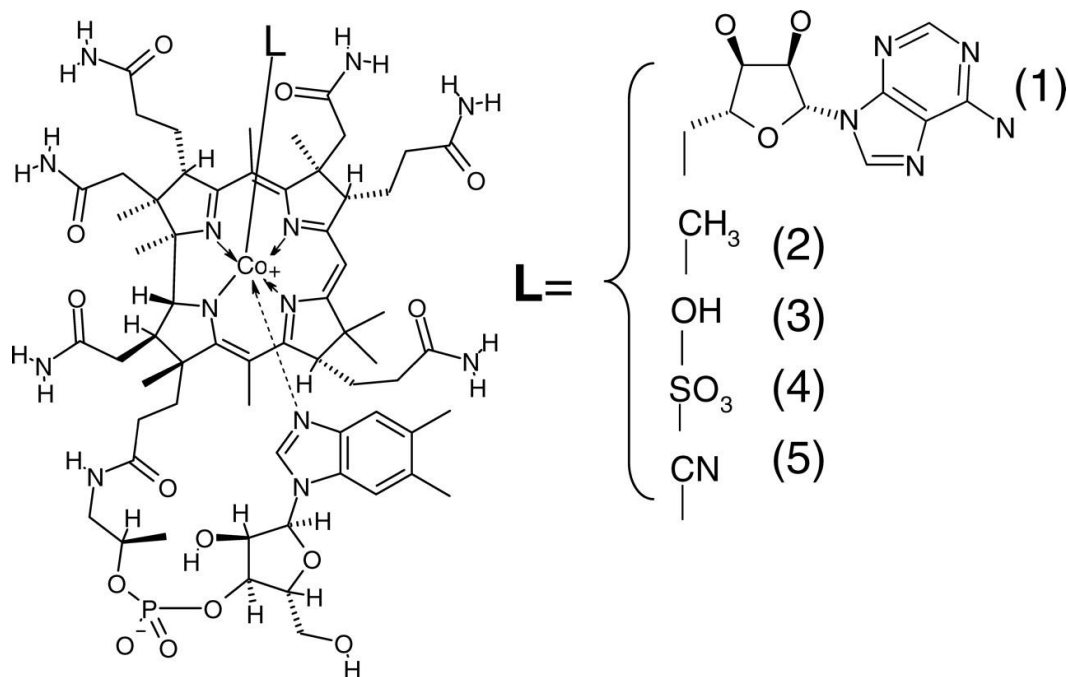
- **nitrokobalamin**

Ligandem je nitroskupina.

- **sulfitkobalamin (4)**

Ligandem je siřičitanový aniont.

Všechny typy vitamínu, které jsou přijaty v potravě, jsou přeměňovány na jejich aktivní formy, které jsou využity jako kofaktory dvou enzymů: metionin syntázy a L-malonylCoA mutázy^{(26), (27), (28), (29), (22)}. Kobalt se může vyskytovat jako jednomocný, dvojmocný či trojmocný. Své oxidační stavy může měnit díky vázaným ligandům. Methylkobalamin, adenosylkobalamin, hydroxykobalamin a akvakobalamin obsahují trojmocný kobalt^{(26), (22), (29)}.



Obr. 2.4: Struktura vitamínu B₁₂ a jeho ligandů⁽³⁰⁾

2.4.3. Zdroje a stálost

Vitamin B₁₂ se řadí mezi esenciální složky, tudíž tělo savců jej nemůže syntetizovat. Proto je nezbytné ho přijímat v potravě. Existují však řasy, houby a mikroorganismy, které jsou schopny si ho sami syntetizovat⁽²⁹⁾. Mikroorganismy v gastrointestinálním traktu savců produkují kobalamin, který se dále ukládá do svalů a vnitřností. Dostává se také do mléka a vajec. K jeho syntéze je potřeba dostatečné množství kobaltu⁽³¹⁾. Denní přísun vitamínu B₁₂ by se měl pohybovat okolo 1 až 2 µg. Toto množství je citelně menší než denní doporučený příjem jiných vitaminů⁽³²⁾.

Játra všech živočichů jsou nejbohatším zdrojem kobalaminu, protože zde dochází k jeho ukládání. Mezi další zdroje patří maso, vejce, mléko, sýry nebo mořské plody. V potravě je kobalamin přítomný ve formě adenosyl- a hydroxykobalaminu. Mléko a mléčné produkty obsahují menší množství kobalaminu nacházející se zde

ve formě methyl- a hydroxykobalamin. Rostlinné produkty neobsahují téměř žádné množství kobalaminu. Ve vitaminových doplňcích je obsažen ve formě kyanokobalaminu a hydroxykobalaminu. Kyanokobalamin se v těle přeměňuje na methylkobalamin a adenosylkobalamin^{(31), (33)}.

Během běžného tepelného zpracování potravin nedochází k vysokým ztrátám kobalaminu. Stálost je daná především vazbou na proteiny. Výjimkou však mohou být úpravy jako pasterizace mléka, vaření masa, sušení potravin, mikrovlnný ohřev mléka nebo vystavení nízkým teplotám (okolo 4 °C) po dobu 14 dnů. Ztráty kobalaminu v těchto případech mohou dosáhnout až 50 %⁽³³⁾.

2.4.4. Transport a funkce

Transport kobalaminu z tenkého střeva do tkání zajišťuje vazba na tzv. intrinsic faktor. Tento komplex se váže na membránové receptory střevních buněk, které mu umožní vstup do buněk. Transport kobalaminu v krevní plazmě zajišťují tzv. R – proteiny (transkobalaminy)⁽³⁴⁾. Kobalamin je v potravinách vázán na proteiny. K dalšímu využití je nezbytně nutné vazbu rozrušit. K tomu napomáhá pepsin sloužící k štěpení vazeb mezi proteiny⁽³¹⁾. V žaludku se uvolněný kobalamin naváže na R – proteiny, takto navázaný kobalamin putuje do tenkého střeva, kde je vazba opět rozštěpena pomocí pankreatickým proteázám. Vyvázaný kobalamin se opět váže na intrinsic faktor, který mu umožňuje absorpci⁽³⁵⁾.

Vitamin B₁₂ se podílí na syntéze nukleových kyselin. Má důležitou roli v krvetvorbě a je nezbytný pro vývoj nervových buněk. Hraje také nemalou úlohu v syntéze DNA. Další jeho funkcí je využití jako antidota při otravě kyanidy, kdy se podává hydroxykobalamin, který je schopný vázat kyanidy za vzniku kyanokobalaminu⁽³⁶⁾.

2.4.5. Toxicita a deficience

V současné době se věnuje pozornost pouze nedostatku vitaminu B₁₂. Hypervitaminóza není považována za závažnou a zdraví škodící, tudíž se jí téměř vůbec nevěnuje pozornost. Nadměrný přísun kobalaminu není pro člověka škodlivý na rozdíl od hypovitaminózy. Studie prokázaly, že ani nadměrná dávka (5 mg) podávaná

parenterální cestou nemá žádný negativní vliv na lidské zdraví. Negativní ani pozitivní účinky nadměrného příjmu vitamínu B₁₂ nebyly prokázány. Kromě toxického účinku, nebyly zjištěny mutagenní, karcinogenní, teratogenní ani fetotoxické účinky⁽²¹⁾.

Nedostatek vitamínu B₁₂ se projevuje poruchou metabolismu, objevují se neurologické obtíže, porucha krvetvorby a vznik makrocytární anémie nebo kardiovaskulárních chorob⁽³⁷⁾. Dalšími projevy mohou být vypadávání vlasů, změny pigmentace kůže a nehtů, u mužů impotence až neplodnost. Deficit může narušit také kostní aparát. Deficienci trpí především ti, kteří dodržují vegetariánskou dietu⁽³⁸⁾ a staří lidé trpící malabsorpcí⁽³⁹⁾. Mezi další příčiny se řadí vrozené poruchy nebo podávání některých léčiv jako např. metformin, N₂O, léčiva blokující produkci žaludečních šťáv či perorální kontraceptiva. Je nutno zmínit, že nedostatečný příjem vitamínu B₁₂ je velkým problémem vyspělých zemí⁽³⁷⁾.

2.4.6. Metody stanovení kobalaminu

Vitamin B₁₂ byl již stanovován pomocí různých analytických metod jako například spektrofotometricky⁽⁴⁰⁾, AAS⁽⁴¹⁾ a voltametricky^{(42), (43)}. Stanovuje se především iont Co²⁺, který je přítomný v jeho struktuře. Ke stanovení vitamínu B₁₂ v komplikovaných biologických matricích napomohl vývoj analytických metod využívající značené látky, optické senzory^{(44), (45)}, HPLC^{(46), (47)}, kapilární elektroforézu⁽⁴⁸⁾ a fluorescenční spektrofotometrii⁽⁴⁹⁾. Chemiluminiscenční stanovení vitamínu B₁₂ je založeno na schopnosti Co²⁺, který je přítomný v jeho struktuře, zvýšit intenzitu chemiluminiscenční reakce mezi luminolem a oxidačním činidlem. Iont Co²⁺ má v této reakci katalytickou funkci. Oxidačním činidlem může být jodid draselný (KI)⁽⁵⁰⁾, peroxid vodíku (H₂O₂)⁽⁵¹⁾ nebo rozpuštěný kyslík (O₂)⁽⁵²⁾. Ke stanovení kobalaminu reakcí s luminolem je tedy potřeba vyvázat Co²⁺ z jeho struktury. Vyvázání je možno provádět několika způsoby. K rozkladu organických sloučenin se často využívají koncentrované kyseliny a jejich zahřívání společně se vzorkem⁽⁵³⁾. Obrovskou nevýhodou takového postupu je velká spotřeba koncentrovaných činidel, možnost sekundární kontaminace vzorku a v neposlední řadě časová náročnost samotného rozkladu. K rutinnímu používání je potřeba nalézt jednoduchou a rychlou úpravu vzorku. Elegantním řešením výše uvedených problémů je přidání malého množství oxidačního činidla ke vzorku a následné ozáření UV^{(54), (55), (56)}.

Tab. 2.1: Limity detekce různých analytických metod pro detekci vitamínu B₁₂ a jejich aplikace na reálných vzorcích ⁽⁵⁷⁾

Metoda	LOD	Aplikace
Chemiluminiscence	5 pg.ml ⁻¹	farmaceutické preparáty
ELISA	0,0009 µg.g ⁻¹	potraviny
RIA	0,005 µg.ml ⁻¹	krevní vzorky
MBA	0,03 µg.g ⁻¹	sinice
Biosens-SPR	0,02 µg.g ⁻¹	kojenecká výživa
CE-ICP-MS	0,02 µg.ml ⁻¹	multivitaminové preparáty
HPCE	20 µg.ml ⁻¹	separace a stanovení pyrolového jádra
HPLC	0,04 µg.ml ⁻¹	multivitaminové přípravky
MM-HPLC	0,025 µg	B – komplex
HPLC-AAS	42 µg.ml ⁻¹	maso a játra
HPLC-ESIMS	0,002 µg.g ⁻¹	sušené mléko
Spectrofotometricky	35 µg.ml ⁻¹	syntetické směsi vitamínu a vitaminové injekce B ₁₂

2.5. Luminiscence

Zavedení pojmu luminiscence sahá do konce 19. století. Latinsky lumen znamená světlo. Odpovídajícím českým ekvivalentem by bylo světélkování. Luminiscencí látek se rozumí přebytek elektromagnetického záření. ⁽⁵⁸⁾ Luminiscence je nerovnovážným dějem. Pojem luminiscence zahrnuje jak fluorescenci, tak fosforescenci. Fluorescence je definována jako emise světla s neměřitelně krátkým dohasínáním po ukončení excitace. Tento jev byl poprvé pozorován u CaF₂. Fosforescencí se rozumí dlouhodobá emise světla po ukončení budícího záření ⁽⁵⁸⁾. Většina organických (aromatické uhlovodíky, benzen, naftalen, antracén a organická

barviva), stejně tak část anorganických sloučenin (iontové krystaly a polovodiče) vykazuje luminiscenci. Příčina luminiscence se v obou těchto případech velmi liší. V organických látkách je příčinou luminiscenčního záření molekula. Díky tomu má luminiscenční záření velmi podobné rysy jak v roztoku, tak i v krystalickém stavu. U organických látek v roztoku a pevné fázi se luminiscenční spektrum téměř neliší. Luminiscence anorganických látek v pevném stavu souvisí se schopností vytvořit soubor alespoň několika desítek atomů. Luminiscenčního projevu však dosahují útvary o laterálním rozměru asi 1 μm obsahující řádově 10^{10} atomů⁽⁵⁸⁾. Luminiscence pevných anorganických látek může být vlastní (intrinsická), nevlastní či příměsová (extrinsická).

Luminofor, látka schopná světélkování, přijme energii, dojde k excitaci na vyšší energetickou hladinu. Při následné deexcitaci na základní energetickou hladinu dojde k vyzáření energie ve formě světla. Druhy luminiscence lze rozdělit podle druhu excitační (budící) energie.

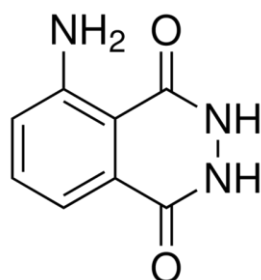
Tab. 2.2: Klasifikace luminiscenčních dějů (58)

druh luminiscence	budící energie
fotoluminiscence	fotony
elektroluminiscence	elektrický proud procházející látkou
chemiluminiscence	chemická reakce
bioluminiscence	fyziologické biochemické reakce
katodoluminiscence	vysokoenergetický ($10^2 - 10^3$ eV) elektronový svazek
mechanoluminiscence	mechanická deformace
termoluminiscence	tepelná energie
rentgenoluminiscence	RTG – záření
sonoluminiscence	akustické/ultrazvukové kmity
triboluminiscence	tření

Luminiscence je hojně využívána k analýze DNA, proteinu a polutantů ovzduší jako oxidů dusíku (NO_x) ozonu (O_3) či některé organofosfáty jako bojové plyny⁽⁵⁹⁾.

2.6. Luminol

Systematický název 5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion byl poprvé syntetizován v roce 1853. Patří mezi významnou látku s chemiluminiscenčními vlastnostmi. Luminol je nažloutlá krystalická látka s omezenou rozpustností ve vodě. Dobře se rozpouští v alkalických roztocích s optimálním pH 9-10 ⁽⁶⁰⁾. Po styku s oxidačním činidlem v bazickém prostředí emituje modré světlo. Tento jev byl pozorován a zkoušen německým chemikem H. O. Albrechtem v roce 1928, který zjistil, že reakce mezi luminolem a H_2O_2 vyžaduje malé množství volného či do komplexu vázaného přechodného kovu (Cr^{3+} , Mn^{4+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+}) jako katalyzátoru ⁽⁶¹⁾. Katalytická schopnost krve, jejíž součástí je hemoglobin obsahující ve své struktuře železnaté ionty, byla objevena až v roce 1937 německým forenzním vědcem Walter Specht ⁽⁶²⁾. Tím si našel luminol své uplatnění v kriminalistice, biochemii a biologii ⁽⁶³⁾. Jeho strukturní vzorec je uveden na obr. 2.5.

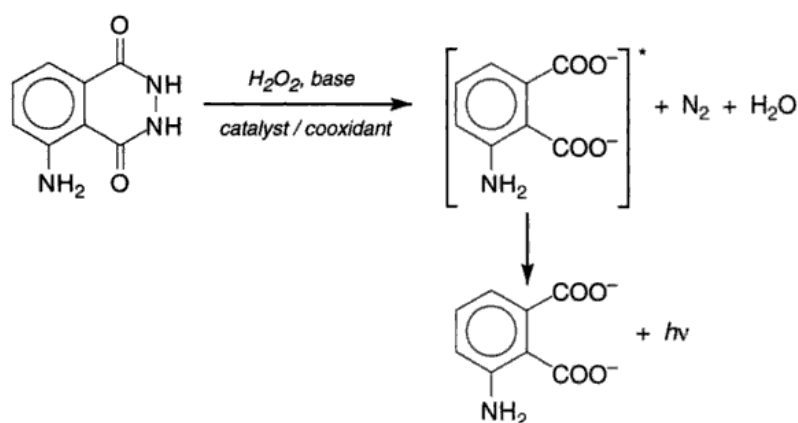


Obr. 2.5: Strukturní vzorec luminolu

Roztoky luminolu jsou velmi málo stabilní na světle. Luminol je teplotně nestabilní, proto by jeho roztoky neměly být vystavovány vysokým teplotám. Bod tání 319–320 °C. Hodnoty $\text{pK}_{\text{a}1}$ a $\text{pK}_{\text{a}2}$ (6,74 a 15,1) odpovídají ztrátě dvou vodíků přítomných na hydrazinové skupině ⁽⁶⁴⁾. V kyselém prostředí se proto luminol vyskytuje v plně protonizované formě jako (LH_2) a v bazickém prostředí od $\text{pH} > 7$ se nachází v monodeprotonizované (LH^-) či plně deprotonizované (L^{2-}) formě ⁽⁶⁵⁾.

Mechanismus probíhající reakce je vidět na obr. 2.6. Principem je katalytický efekt Co^{2+} přítomném ve struktuře kobalaminu. Nejprve je nutno Co^{2+} z jeho struktury vyvázat. Jakmile je Co^{2+} vyvážen ze struktury vitamínu, dochází ke katalýze oxidační reakce luminolu s H_2O_2 . Luminol je excitován na vyšší energetickou

hladinu. Tento stav je velmi nestabilní, a proto dochází k jeho deexcitaci na základní energetickou hladinu. Při deexcitaci se emituje elektromagnetické záření o vlnové délce okolo 441 nm. Proces oxidace luminolu a vyzáření světla je více krokový. Proto může být ovlivněn některými faktory jako: pH, teplota, iontová síla reakčních roztoků, reaktivní částice interagující s luminolem, ionty kovů či alkalických hydroxidů sloužící jako katalyzátor⁽⁶⁶⁾.



Obr. 2.6: Mechanismus oxidace luminolu peroxidem vodíku v bazickém prostředí⁽⁶¹⁾

Při deexcitaci ve vodných roztocích má uvolněné světlo barvu od fialově modré po modro zelenou. Maximum emise luminolu má široký spektrální rozsah (420 - 455 nm), a to díky rozdílným parametrům a látkám přítomných při reakci⁽⁶⁷⁾. Probíhá-li reakce v bazickém prostředí vodného roztoku, je pro její uskutečnění nezbytná přítomnost katalyzátoru. Katalyzátory mohou být přechodné kovy či metalokomplexy. V závislosti na typu katalyzátoru je vybráno optimální pH, za kterých reakce probíhá. Rozmezí pH se pohybuje od pH 8-11, což také napovídá tomu, že reakce probíhá mnoha typy reakčních mechanismů⁽⁶⁸⁾.

2.7. Možnosti rozkladu vitaminu B₁₂

Ke stanovení vitaminu B₁₂ chemiluminiscencí je nutné vyvázat z jeho struktury iont Co²⁺.

2.7.1. Acidifikace vitaminu B₁₂ pomocí 0,1 M HCl

V práci podle Songa a Hou byl 1 ml vitaminové ampule obsahující 0,5 mg vitaminu B₁₂ acidifikován 10 ml 0,1 M HCl⁽⁵²⁾. Směs byla dále převedena do 25 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Připravený roztok byl okamžitě proměřen. Efektivita rozkladu vitaminu B₁₂ dle autorů byla 99,34 – 101,37%.

2.7.2. Přídavek oxidačního činidla a následné UV ozáření

Pulgarín a kol. k rozkladu vitaminu B₁₂ použili přídavek oxidačního činidla, které v tomto případě představuje 0,92 mmol.l⁻¹ roztok peroxodisíranu draselného (K₂S₂O₈). Vzniklá směs byla následně po dobu 60s ozářena UV lampou⁽⁵³⁾. Výhodou tohoto elegantního postupu je možnost zapojení online a snížení možnosti kontaminace vzorku. Autoři článku použili ke stanovení preparáty vitaminu B₁₂ o koncentraci 500 a 5000 mg.l⁻¹. Jako optimální podmínky rozkladu vitaminu B₁₂ autoři vybrali c_(K₂S₂O₈) = 0,92 mmol.l⁻¹ s dobou ozařování 1 minuta. Dle naměřených výsledků byl rozklad vitaminu B₁₂ proveden s 97% úspěšností.

2.7.3. Acidifikace pomocí HNO₃ a následné vypaření

Ve své práci Han a Zhang přidali k 1 ml vitaminu B₁₂ 5 ml koncentrované HNO₃. Směs nechali povařit ve varné lázni až do jejího úplného vypaření⁽⁷⁰⁾. Po vychladnutí rezidua na pokojovou teplotu přidali malé množství destilované vody. Ve vzniklém roztoku stanovovali uvolněné ionty Co²⁺ z vitaminu B₁₂. V jejich práci není uvedena účinnost rozkladu ani koncentrace použitých reálných vzorků vitaminu B₁₂. Výsledky práce porovnali s hodnotami naměřenými pomocí ICP–AES. Výsledky se od sebe významně nelišily.

2.7.4. Rozklad na mokré cestě

Mokrý rozklad se provádí v přítomnosti koncentrovaných kyselin, vysoké teploty a atmosférickém tlaku⁽⁷¹⁾. K ohřevu reakční směsi v otevřeném nebo uzavřeném systému je nyní velmi využíván mikrovlnný způsob. Biologická matrice je oxidována příslušnými činidly. Dochází nejprve k rozrušení matrice kyselou hydrolýzou a následně dochází k oxidaci meziproductů. Tento typ rozkladu probíhá za nižších teplot než je tomu u suchého rozkladu a to z důvodu bodu varu používaných oxidačních činidel. Mezi nejpoužívanější oxidační činidla patří samotná HNO_3 nebo její směs s H_2O_2 , H_2SO_4 či HClO_4 ^{(72) (73)}. Krachler ve své práci testoval mikrovlnný rozklad jako krok předcházející stanovení 16 prvků (Bi, Cd, Co, Cs, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Tl a Zn) pomocí ICP-MS⁽⁷⁴⁾. Techniky mikrovlnného rozkladu při přípravě vzorků se používají pro zpracování různých druhů materiálů. Mezi ně patří biologické, geologické a kovové materiály či vzorky ze životního prostředí⁽⁷¹⁾. Pro mineralizaci pevné formy doplňku stravy obsahující vitamin B_{12} byla využita směs 4 ml cc. HNO_3 a 2 ml 30% H_2O_2 . Směs byla nejdříve dána do teflonové nádoby obsahující 0,5 g rozdrobeného vitaminového preparátu a potom umístěna do rozkladného zařízení. Po skončení programu bylo nutno počkat až do vychladnutí směsi a poté byl v ní stanoven obsah analytu.

2.8. Interference

Vzhledem k tomu, že ke chemiluminiscenční stanovení vitaminu B_{12} je využit katalytický efekt iontu Co^{2+} , je potřeba brát v úvahu možnost ovlivnění stanovení jinými ionty. Reakci mohou katalyzovat ionty jak přechodných kovů, tak i aniontů jako např. Cu^{2+} , Ni^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Zn^{2+} , Cr^{3+} dále NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , NO_3^- , I^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , BrO_3^- , NO_2^- , glukóza, ethanol nebo oxalát^{(52), (69)}. Dle autorů Song a Hou byla vybrána 5% tolerance poměru změny signálu vitaminu B_{12} o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-9} \text{ g.l}^{-1}$ a signálu v přítomnosti interferentu. Pro látky typu Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , BrO_3^- byl tento poměr $1,0 \cdot 10^6$, poměr $5 \cdot 10^5$ pro NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , ethanol, $2,0 \cdot 10^4$ pro Cu^{2+} , Ni^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Zn^{2+} , Cr^{3+} .

2.9. Statistické zpracování výsledků

V diplomové práci byly využity různé typy bodových odhadů, které slouží ke statistickému zpracování naměřených dat. Bodový odhad je přibližná hodnota neznámého parametru, která odhaduje jedinou hodnotou. Jednotlivá měření byla prováděna 3krát. Z těchto hodnot byl následně vybrán medián jako prostřední hodnota. Pro znázornění chybových úseček jednotlivých měření byly použity tyto tři hodnoty jednotlivých měření a vypočtena jejich směrodatná odchylka, která odpovídá kolísání hodnot okolo mediánu.

2.9.1. Aritmetický průměr

Patří mezi nejpoužívanější odhady střední hodnoty sledované veličiny. Je to součet hodnot dělený jejich počtem. Nedostatkem jeho použití může být v nesprávném odhadu normálního (Gaussova) rozdělení dat.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

2.9.2. Medián

Medián je střední hodnota z výběru seřazeného podle velikosti ($x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_n$). Je vhodné jej využívat k odhadu střední hodnoty při malém počtu analytických výsledků. U souboru s lichým počtem hodnot se medián určí jako prostřední hodnota. Pro soubor se sudým počtem hodnot se medián vypočte jako aritmetický průměr dvou prostředních hodnot. Jedná se o nestranný a robustní odhad, který však není příliš vydatný⁽⁷⁵⁾.

2.9.3. Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je v analytické chemii velice využívána vzhledem k tomu, že má stejné jednotky jako měřená data. Směrodatná odchylka spjatá s průměrem či mediánem ukazuje část nejistoty, která je pozorována v konkrétním

experimentu ⁽⁷⁵⁾. Směrodatná odchylka je menší než výběrová směrodatná odchylka, která napomáhá odhadnout rozmezí, ve kterém se budou hodnoty měření pohybovat.

2.9.4. Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku ⁽⁷⁶⁾. V této diplomové práci byla opakovatelnost vypočtena z deseti po sobě jdoucích měření. Následně z těchto hodnot vypočten průměr a směrodatná odchylka. Opakovatelnost se vypočte podle vzorce pro relativní směrodatnou odchylku.

2.9.5. Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka (RSD) též nazývaná variační koeficient (CV). Slouží jako měřítko šíření dat ve srovnání s průměrem dat, k měření rozptylu dat, kdy je rozptyl přímo úměrný koncentraci ⁽⁷⁵⁾. V analytické chemii je poměrně častým případem, že relativní směrodatná odchylka je konstantní v širokém rozsahu koncentrací.

$$RSD = CV = \frac{s}{\bar{X}}$$
$$\% RSD = \% CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

2.9.6. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti slouží k popisu nejnížší koncentrace měřené veličiny, která může být s určitou spolehlivostí změřena daným analytickým postupem. Mez detekce (LOD) je nejnížší koncentrace analytu, kterou je možné s určitostí odlišit od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnížší možná koncentrace, která může být spolehlivě stanovena na určité hladině spolehlivosti ⁽⁷⁷⁾. LOD se vypočte

jako trojnásobek směrodatné odchylky (σ) z deseti opakovaných měření vzorku o nejnižší koncentraci či základní linie⁽⁷⁵⁾. LOQ jako $10 \cdot \sigma$.

2.9.7. Dixonův Q – test

Slouží k vylučování extrémních hodnot z menšího souboru dat. Výsledná hodnota Q se porovnává s kritickou hodnotou pro příslušný soubor dat a zvolenou hladinu spolehlivosti (α). Pokud nastane případ, že $Q_n > Q_k$, hodnota je ze souboru dat vyloučena⁽⁷⁵⁾.

$$Q = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1}$$

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístrojové vybavení a instrumentace

- Spektrofotometr QE65000 (Ocean Optics, USA) s optickým vláknem QP-600-2-UV/VIS-SR (Ocean Optics, USA) o průměru 600 μm jako detektor pro měření intenzity chemiluminiscence, průtoková detekční cela o délce absorpčního prostředí 1 cm
- Peristaltické čerpadlo C. P. 78017-20 (Ismatec, USA)
- Peristaltické čerpadlo (Masterplex L/S, USA)
- Tygonové hadičky o průměru 0,76; 0,89; 1,02; 1,14 a 2,06 mm (Cole-Parmer, USA)
- Dávkovací cívky o objemech 20, 40, 60, 80 100, 250, 500 μl (vlastní výroba), tvořené teflonovými kapilárami stočenými do spirál
- Počítač HP vybavený softwarem SpectraSuite (Ocean Optics, USA) pro zaznamenání a zpracování signálu, Origin 8.1 (OriginLab, USA) k vyhodnocení a vizualizaci dat
- Šesticestný dávkovací ventil
- Osmicestný dávkovací ventil
- FIALab 3500-B
- Počítač Dell Optiplex 790 vybavený softwarem SpectraSuite (Ocean Optics, USA) a softwarem FIALab for Windows 5 pro ovládání SIA aparatury.

3.2. Použité chemikálie

- Luminol (3-aminophthalhydrazide); $M_r = 177,16$; čistota 97% (Sigma – Aldrich, USA)
- H_2O_2 30%, čistota p.a.; $M_r = 34,01$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, čistota p.a; $M_r = 290,152$ (Lachema Brno, ČR)
- Na_2CO_3 bezvodý, čistota p.a.; $M_r = 105,99$ (Lachema Brno, ČR)
- NaHCO_3 ; čistota p.a., $M_r = 84,01$ (Lachema Brno, ČR)

- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; čistota p.a., (Lachema Brno, ČR)
- NaOH, čistota p.a.; $M_r = 39,99$ (Lachema Brno, ČR)
- HNO_3 65%, pro analýzu EMSURE® ISO (Merck Millipore, USA)
- HCl 37%, ACS reagent, $M = 36,46$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Deionizovaná voda produkovaná zařízením Mili QPLUS (Millipore; USA)
- Vitamin B_{12} 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Zentiva, ČR)
- Vitamin B_{12} 100 μg (Natures bounty Inc., USA)
- Roztoky iontů Cu^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} o koncentraci 1000 mg.l^{-1} , všechny vázané na referenční materiál, rozpuštěný v HNO_3 o koncentraci 0,5 mol.l^{-1} ; Certipur® (Merck Millipore, USA)
- $\text{Na}(\text{NO}_2)$ v H_2O ; 1000 mg.l^{-1} NO_2^- Certipur® (Merck Millipore, USA)

3.3. Příprava roztoků

- *Příprava 100 ml 16,9 mmol.l^{-1} roztoku luminolu o pH 9,00 v uhličitanovém pufriu:*

V 60 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,4 g Na_2CO_3 a 0,3 g luminolu, poté přidáno 2,4 g NaHCO_3 a 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Vše bylo potřeba důkladně promíchat. Poté byl roztok doplněn destilovanou vodou po rysku. pH roztoku bylo upravováno přidávkou pevného NaOH za stálého měření pH-metrem.

- *Příprava 100 ml 0,5% H_2O_2 :*

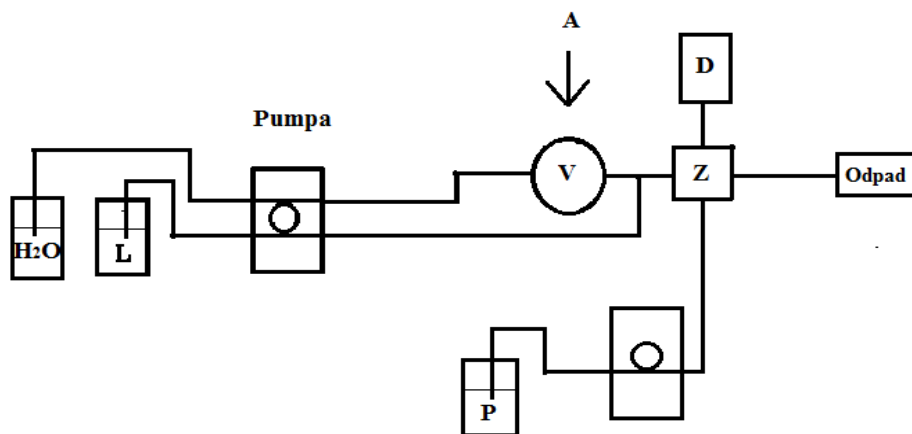
Do 100 ml baňky byla přidána destilovaná voda, pomocí automatické pipety bylo odpipetováno 1,66 ml 30% H_2O_2 . Zbytek byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

- *Příprava 100 ml standardního roztoku Co^{2+} o koncentraci 1000 mg.l^{-1} :*

Bylo naváženo 0,31g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, poté kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Roztok bylo potřeba řádně promíchat a doplnit destilovanou vodou po rysku.

3.4. Aparatura použitá pro FIA stanovení

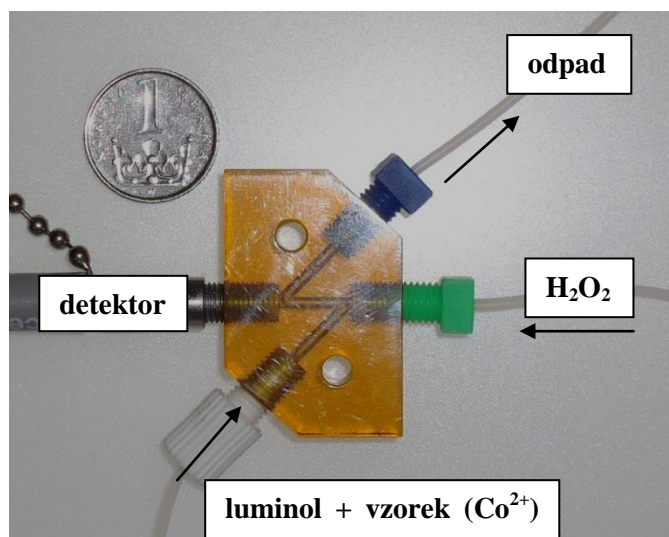
Ke stanovení vitamínu B₁₂ (iontu Co²⁺) metodou FIA s chemiluminiscenční detekcí byla v laboratoři sestavena aparatura, která je znázorněna na obr. 3.1.



Obr. 3.1: Schéma aparatury pro měření intenzity chemiluminiscenčního záření

P – roztok peroxidu vodíku, H₂O – destilovaná voda, L – roztok luminolu, V – šesticestný dávkovací ventil, A – přívod analytu, Z – průtoková detekční cela, D – spektrometrický detektor

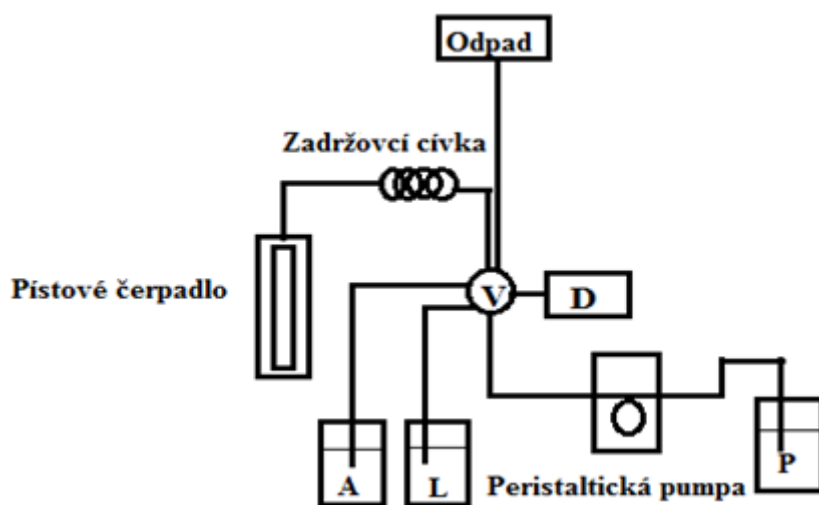
Nosným tokem analytu je voda. Vzorek je dávkován šesticestným dávkovacím ventilem. Před průtokovou detekční celou (obr. 3.2) je zaváděn roztok luminolu, který je připraven v uhličitanovém pufru. V místě zavádění luminolu dochází k jeho promíchání s analytem (roztok Co²⁺) dávkovaným do proudu nosného toku (vody). Směs je vedena dále do průtokové detekční cely, kde do optické dráhy detektoru je zaváděn H₂O₂ po směru proudu reakční směsi. Při smíchání roztoku obsahující luminal s peroxidem vodíku dochází k oxidaci a excitaci luminolu. Přítomný Co²⁺ slouží jako katalyzátor. Následnou deexcitací luminolu na základní energetickou hladinu dojde k vyzáření světla o vlnové délce s maximem při 441 nm, které je detekováno spektrofotometricky. K určení koncentrace analytu je využíváno zvýšení intenzity luminiscence. $\Delta I = I_s - I_0$, kde I_s a I_0 jsou signály v přítomnosti a absenci analytu.



Obr. 3.2: Průtoková detekční cela

3.5. Aparatura použitá pro SIA stanovení

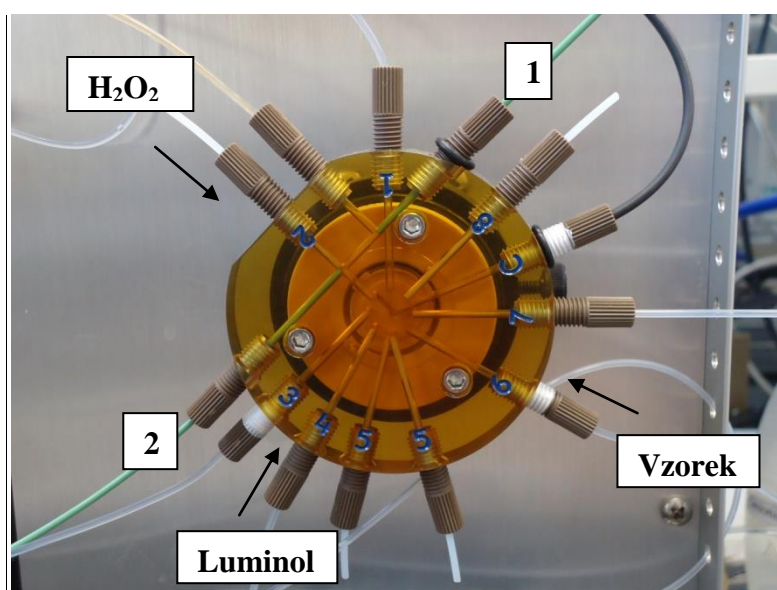
K využití SIA techniky byla použita komerčně vyráběná SIA aparatura FIALab 3500 od firmy FIALab, USA, jehož uspořádání je vidět na obr. 3.3.



Obr. 3.3: Schéma SIA aparatury pro měření intenzity chemiluminiscenčního záření
P – roztok H_2O_2 , L - roztok luminolu, V – osmicestný selekční ventil, A – analyt, D – spektrometrický detektor

V tomto uspořádání je pomocí pístového čerpadla a vhodné polohy osmicestného selekčního ventilu nasáván do zadržovací cívky přesně definovaný objem vzorku

a luminolu. V zadržovací cívce dochází k jejich vzájemnému mísení. Následně je směs pomocí obráceného pohybu pístového čerpadla transportována do selekčního ventilu nastaveného směrem do optické osy detektoru. V okamžiku vstupu reakční směsi do optické dráhy detektoru dojde ke spuštění peristaltického čerpadla, které čerpá H_2O_2 do optické osy selekčního ventilu, čímž je vyvolána intenzivní chemiluminiscence. Intenzita chemiluminiscenční reakce je následně pomocí optického vlákna vedena do detektoru. Schéma osmicestného selekčního ventilu je znázorněno na obr. 3.4.



Obr. 3.4: Schéma osmicestného selekčního ventilu SIA techniky a možnosti zapojení optického kabelu pro snímání chemiluminiscenčního záření

4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

4.1. Složení reakční směsi

Prvním úkolem bylo nalézt vhodné složení reakční směsi tak, aby bylo dosaženo stabilního a zároveň intenzivního emisního signálu chemiluminiscenční reakce, který by byl dále využit ke stanovení analytu.

Nejprve byl připraven roztok luminolu dle článku od autorů Pulgarín a Bormejo o koncentraci $8,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ v uhličitanovém pufru o pH 10, roztok Co^{2+} o koncentraci 1000 mg.l^{-1} a roztoky H_2O_2 o koncentracích 0,1; 0,5; 1,5; 5,0 a 10 %. Aparatura byla téměř totožná s obr. 3.1. Zapojení se mírně lišilo v tom, že jednotlivé roztoky byly samostatně zaváděny pomocí peristaltické pumpy a k dávkování vzorku nebyl využíván šesticestný dávkovací ventil, nýbrž vzorek byl zaváděn kontinuálně pomocí peristaltické pumpy. V rámci prvotních experimentů byla vyzkoušena také možnost zavádět jednotlivá reakční činidla do průtokové detekční cely proti ose optického vlákna vedoucí emitované záření do spektrometru. Jako optimální se jevílo zavádět H_2O_2 přímo do průtokové detekční cely tj. do osy optického vlákna. Výsledné zapojení průtokové detekční cely je možné vidět na obr. 3.2. Podmínky stanovení po optimalizacích průtoků reagensů byly následující: $c_{(\text{lum})} = 8,00 \text{ mmol.l}^{-1}$; $c_{(\text{Co}^{2+})} = 1000 \text{ mg.l}^{-1}$; $v_{(\text{lum})} = 0,8 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$, 0,1% H_2O_2 . Uvolněné chemiluminiscenční záření mělo při výše zmíněných optimálních podmínkách stanovení velmi nízkou intenzitu, která se pohybovala okolo hodnoty 8636 ± 50 .

Vzhledem k tomu, že při protřepání odpadní nádoby obsahující odpadní roztoky vedoucí z detekční cely byla pozorována intenzivní luminiscence, bylo zřejmé, že v detekční cele prakticky žádná oxidace luminalu neprobíhá. Byly tedy hledány příčiny této skutečnosti. Za účelem zvýšení intenzity chemiluminiscenčního záření bylo vyzkoušeno zavedení plynného O_2 , roztoku 1M HCl i roztoku 0,5M KMnO_4 do reakční směsi před vstupem do průtokové cely, což však nepřineslo žádné zlepšení. Bylo také zkoušeno zavádět jednotlivé roztoky samostatně, nikoliv ve směsi. Roztok vystupující z průtokové detekční cely, byl v důsledku promíchání všech reagensů hnědočerně zbarvený a neobsahoval sraženinu. Vzhledem k možnosti ulpívání případných nečistot na křemenném sklíčku oddělující optické vlákno od reakční směsi, bylo vhodné zařadit

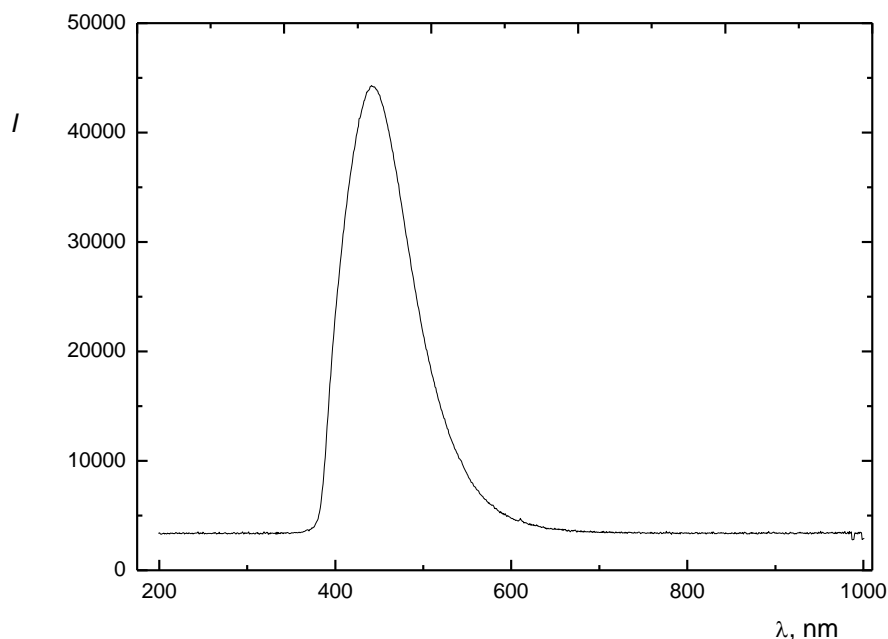
promývací krok mezi jednotlivá měření. Mezi jednotlivými měřeními byla detekční cela promývána zředěnou HNO_3 . Avšak ani tento čistící cyklus nevedl ke zvýšení intenzity chemiluminiscenčního záření. Chemiluminiscenční signál byl stále velmi nízký, obdobně jako při prvotních experimentech. Složení reakčního roztoku bylo tedy nevyhovující. Možnou příčinou mohlo být, že daná reakce při takovémto složení reakčního roztoku neprobíhala při optimálním pH prostředí, které je pro danou chemiluminiscenční reakci nutné.

Následně byl připraven další typ roztoku luminolu dle experimentů D. Fleminga a O. Šimůnka z Bristolské univerzity ⁽⁷⁸⁾. Roztok luminolu byl připraven v uhličitanovém pufru (kombinace Na_2CO_3 , NaHCO_3 a $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$). Ve statickém uspořádání byl k připravenému roztoku luminolu přidán roztok Co^{2+} a poté přikápnut 30% H_2O_2 . Byla pozorována poměrně intenzivní chemiluminiscence, která trvala několik sekund. Během reakce nevznikala žádná sraženina. Roztok pouze změnil barvu na tmavohnědou až černou.

4.1.1. Postup přípravy reakčního roztoku

K přípravě reakčního roztoku luminolu byly vždy použity stejné navážky uhličitanů na 100 ml roztoku, které zajišťují stabilní pH. Navážka luminolu rozpuštěného v uhličitanovém pufru byla měněna dle optimalizačních požadavků. Jak bylo patrné z provedených experimentů, při přípravě roztoku luminolu v uhličitanovém pufru bylo nutné přidávat jednotlivé látky v přesně daném pořadí, s ohledem na rozpustnost luminolu při daném pH. Při nízkém pH není luminol zcela rozpuštěn. U vysokého pH roztoku není žádná změna pozorována. Při přípravě 100 ml reakčního roztoku bylo vždy prvně rozpuštěno 0,4 g Na_2CO_3 v 60 ml destilované vody a poté rozpuštěna daná navážka luminolu. Po rozpuštění bylo následně přidáno 2,4 g NaHCO_3 a 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Výsledné pH takto připraveného roztoku bylo $8,65 \pm 0,02$. Na dně bylo vidět zbylé množství nerozpuštěného luminolu. Tento nedostatek byl později odstraněn optimalizací pH reakčního roztoku. Po optimalizaci pH reakčního roztoku bylo zjištěno, že se zvyšujícím se pH stoupá rozpustnost luminolu.

Při kontinuálním uspořádání uvedeném na obr. 3.1. bylo proměřeno emisní spektrum chemiluminiscenční reakce luminolu s peroxidem vodíku, která byla katalyzována přítomnými ionty Co^{2+} . Výsledné spektrum je vidět na obr. 4.1.



Obr. 4.1: Závislost absorbance chemiluminiscenční reakce luminolu s peroxidem vodíku na vlnové délce

$c_{(lum)} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$; $c_{(Co^{2+})} = 1000 \text{ mg.l}^{-1}$, $V_{(Co^{2+})} = 60 \text{ } \mu\text{l}$; $v_{(lum)} = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $v_{(H_2O)} = v_{(H_2O_2)} = 6,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$, $t_{intg.} = 2 \text{ s}$

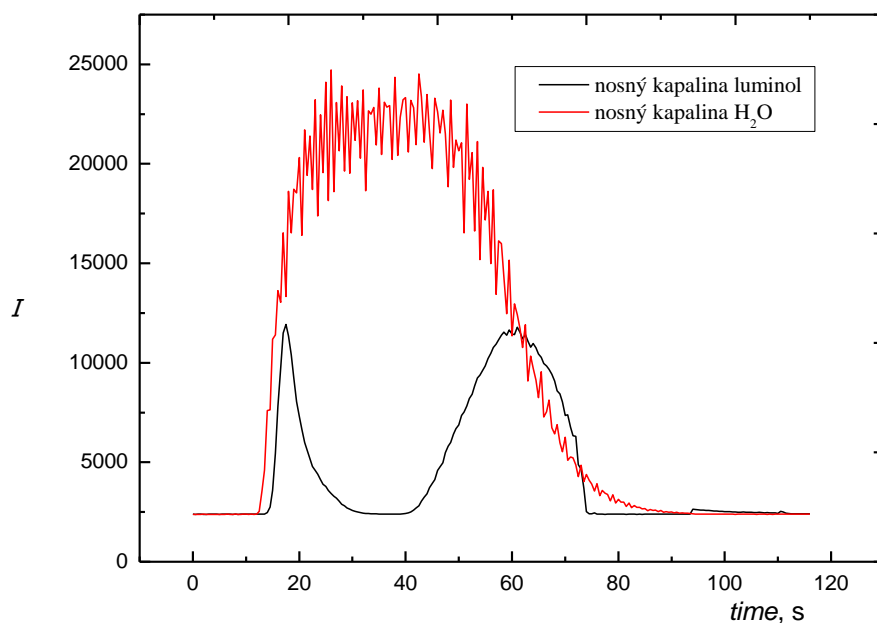
Maximální intenzita dané chemiluminiscenční reakce byla pozorována při vlnové délce $\lambda = 441,33 \text{ nm}$, $I_{baseline} = 2385$ jak je možné vidět na obr. 4.1. Hodnota $I_{baseline}$ byla v dalších experimentech odčítána od naměřených hodnot chemiluminiscenčního záření, což znamená, že při nulové intenzitě chemiluminiscenčního záření byla hodnota $I = 0$. Hodnota maxima emise chemiluminiscenčního záření byla během následujících měření snímána při této vlnové délce jako časová závislost.

4.2. Stanovení Co^{2+} pomocí FIA techniky

Na základě experimentů provedených ve statickém uspořádání bylo pro měření ve FIA uspořádání vybráno složení reakční směsi dle již zmíněných experimentátorů Declana Fleminga a Ondřeje Šimůnka. Pro dané složení reakční směsi bylo potřeba najít takové experimentální podmínky, aby bylo dosaženo maximální a současně časově stabilní intenzity chemiluminiscenčního záření. Bylo nutné optimalizovat koncentrace jednotlivých reakčních činidel, pH roztoku luminolu a v neposlední řadě průtokové rychlosti jednotlivých složek reakční směsi podílejících se na chemiluminiscenční reakci. K dávkování roztoku Co^{2+} bylo využito šesticestného dávkovacího ventilu.

Původně bylo zamýšleno dávkovat analyt jednodušší variantou přímo do proudu nosného toku luminolu, který se uvnitř průtokové detekční cely rovnoměrně promíchal s roztokem H_2O_2 . Toto uspořádání se však neosvědčilo, protože docházelo k nedostatečnému promíchání luminolu se zónou nadávkovaného analytu (40 μl). Důsledkem toho byly detekovány dva prakticky oddělené signály analytu, jejichž maxima odpovídala místům rozhraní zóny analytu s reakčním roztokem, který zde vystupoval jako nosná kapalina. Proto bylo přistoupeno k mírně složitějšímu uspořádání, kdy kromě toku H_2O_2 a luminolu byl zařazen samostatný tok nosné kapaliny (vody). Analyt byl dávkován do nosného proudu H_2O . Tímto již docházelo k dokonalému promíchání zóny analytu s luminolem, což je vidět na obr. 4.2. Výsledné experimentální uspořádání je patrné z obr. 3.1.

Stanovení probíhalo při následujících experimentálních podmínkách. Průtoková rychlost nosného kapaliny (vody) byla $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, luminolu $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, peroxidu vodíku $6,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Koncentrace roztoku luminolu byla $16,9 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a roztoku Co^{2+} $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. K oxidaci luminolu byl použit 0,5% H_2O_2 . Objem dávkovaného roztoku Co^{2+} činil 40 μl . Integroční čas byl nastaven na hodnotu 500 ms.



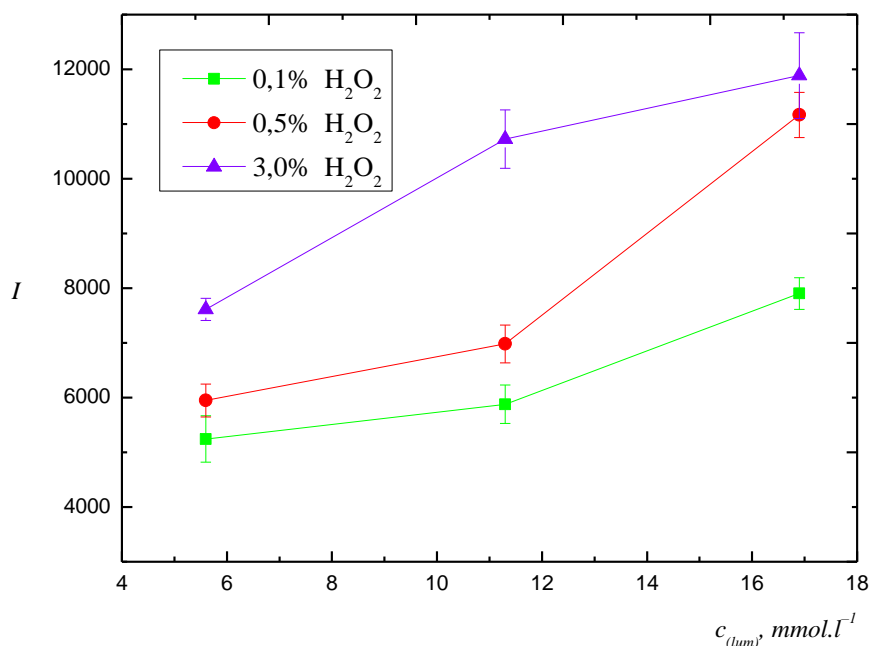
Obr. 4.2: Časová závislost intenzity chemiluminiscenčního záření při různém experimentálním uspořádání

$c_{(lum)} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$; $c_{(Co^{2+})} = 1000 \text{ mg.l}^{-1}$, $V_{(Co^{2+})} = 60 \text{ }\mu\text{l}$; $v_{(lum)} = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $v_{(H_2O_2)} = 6,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(H_2O)} = 0,2 \text{ ml.min}^{-1}$, $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$, $t_{intg.} = 500 \text{ ms}$

Jak je vidět na obr. 4.2 základní linie má průměrnou hodnotu intenzity 2389. V dalších měřeních je tato hodnota odečítána od všech naměřených hodnot intenzit chemiluminiscenčního záření.

4.2.1. Optimalizace koncentrací roztoků H_2O_2 a luminolu

Pro tyto experimenty byly připraveny 3 roztoky o koncentraci luminolu $5,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ (0,1 g luminolu na 100 ml roztoku), $11,3 \text{ mmol.l}^{-1}$ (0,2 g na 100 ml roztoku) a $16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$ (0,3 g na 100 ml roztoku). Dále byly připraveny roztoky 0,1; 0,5 a 3,0% H_2O_2 a roztok Co^{2+} o koncentraci 1000 mg.l^{-1} (0,311 g na 100 ml roztoku). Ve FIA uspořádání byly postupně testovány všechny výše uvedené roztoky v jejich vzájemných kombinacích. Naměřené hodnoty intenzit záření pro jednotlivé koncentrace reakčních činidel jsou zobrazeny na obr. 4.3.



Obr. 4.3: Závislost intenzit záření na koncentraci luminolu a H₂O₂

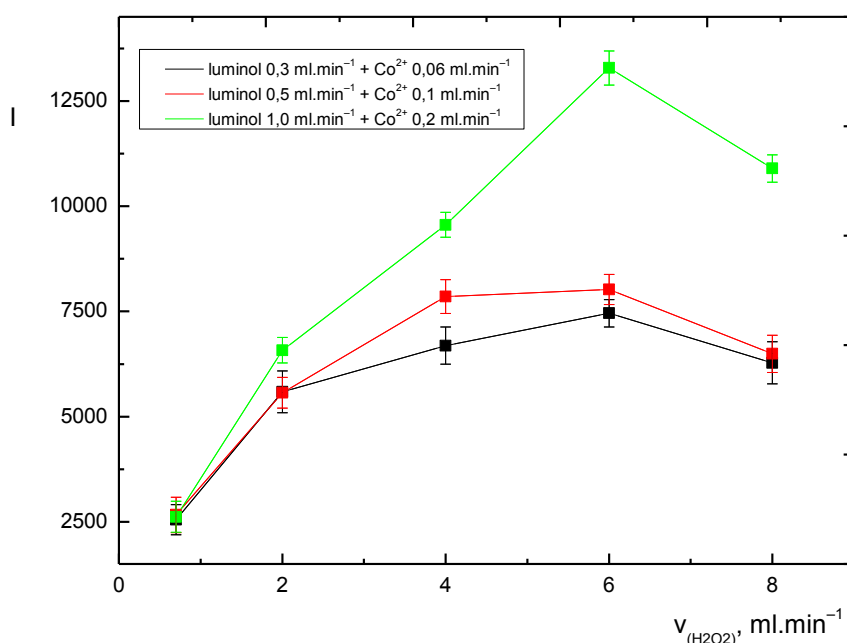
$V_{(Co^{2+})} = 60 \mu l$; $v_{(lum)} = v_{(Co^{2+})} = 2,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(H_2O_2)} = 7,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $c_{(Co^{2+})} = 1000 \text{ mg.l}^{-1}$, $t_{intg} = 500 \text{ ms}$

Nejvyšší intenzity bylo dosaženo při koncentraci luminolu 16,9 mmol.l⁻¹ v kombinaci s 3,0% H₂O₂. Avšak vzhledem k veliké nestabilitě signálu v čase byla pro další měření vybrána koncentrace luminolu 16,9 mmol.l⁻¹ v kombinaci s 0,5% H₂O₂. Tato kombinace roztoků poskytuje nižší avšak výrazně stabilnější signál. Mezi jednotlivými měřeními byl zařazen promývací krok zředěnou HNO₃ a poté destilovanou vodou. Zařazením promývacího kroku bylo dosaženo lepší opakovatelnosti měření. Vyšší koncentrace luminolu nebyly z ekonomických důvodů testovány, i když by pravděpodobně s ještě více koncentrovanějšími roztoky luminolu došlo k mírnému navýšení signálu.

4.2.2. Optimalizace průtokových rychlostí roztoku Co²⁺ a luminolu

Na základě výsledků předešlých optimalizací byl pro přípravu reakční směsi vybrán 16,9 mmol.l⁻¹ roztok luminolu a k jeho oxidaci 0,5% H₂O₂. Ve všech případech byl používán roztok Co²⁺ o koncentraci 1000 mg.l⁻¹. K dispozici byly pouze dvě

peristaltické pumpy. Jedna pumpa čerpala H_2O_2 a druhá pumpa nasávala roztok luminolu a vody, který sloužil jako nosná kapalina pro vzorek. Aby bylo docíleno změny průtokové rychlosti dávkovaného vzorku, byl zaměněn průměr čerpací hadičky nasávající vodu, což odpovídalo změně průtokové rychlosti roztoku Co^{2+} . Z hlediska dostatečného promíchání zóny Co^{2+} s luminolem není proto potřeba, aby protékal vysokou rychlostí. Spíš se jako vhodné jeví nízký průtok zóny Co^{2+} , což způsobí dostatečné promíchání s luminolem. Byly proměřeny různé hodnoty průtokové rychlosti luminolu a roztoku Co^{2+} . Výsledné závislosti jsou uvedené na obr. 4.4. Pro zvolené průtokové rychlosti roztoků luminolu a kobaltu byly voleny různé průtokové rychlosti peroxidu vodíku v rozmezí ($0,5 - 8,0 \text{ ml min}^{-1}$).



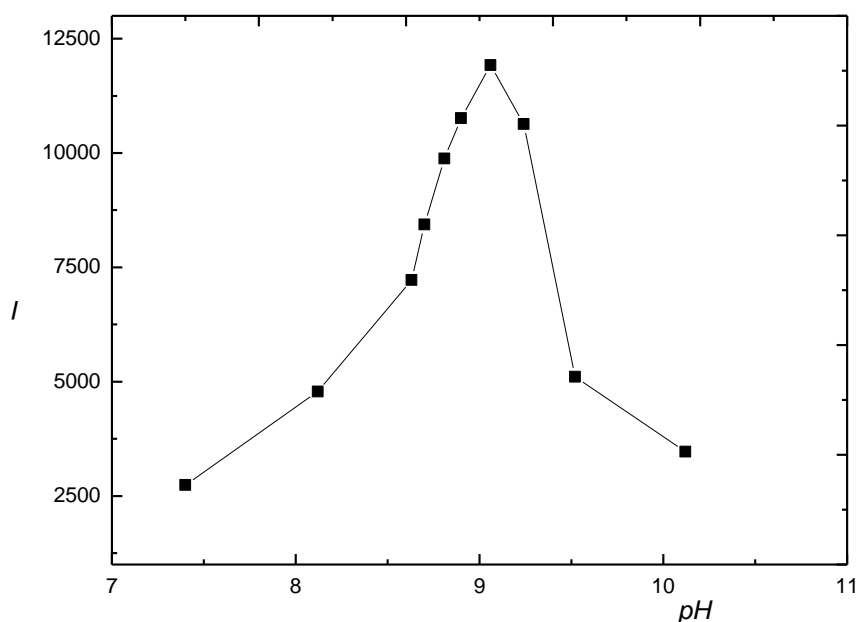
Obr. 4.4: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na průtokových rychlostech $V_{(Co^{2+})} = 60 \mu\text{l}$, $c_{(lum)} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $pH = 8,65$; $c_{(Co^{2+})} = 1000 \text{ mg.l}^{-1}$, $0,5\% H_2O_2$, $t_{intg.} = 500 \text{ ms}$

Ke grafickému zpracování byly vybrány hodnoty průtokové rychlosti luminolu ($0,3$; $0,5$ a $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$) a roztoku Co^{2+} ($0,06$; $0,1$ a $0,2 \text{ ml.min}^{-1}$). Jak je vidět na obr. 4.4 nejvyšší intenzity záření bylo dosaženo při průtoku peroxidu vodíku $6,0 \text{ ml.min}^{-1}$, luminolu $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ a pro roztok Co^{2+} $0,2 \text{ ml.min}^{-1}$.

4.2.3. Optimalizace pH reakčního roztoku

Pro tyto experimenty bylo připraveno 10 roztoků luminolu o koncentraci $16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$ v různém pH, dále pak roztok Co^{2+} o koncentraci 1000 mg.l^{-1} a roztok 0,5% H_2O_2 . Výchozí pH roztoků bylo upravováno přidavkem hydroxidu sodného (NaOH) či kyseliny chlorovodíkové (HCl). Roztoky o pH 7,40; 8,12; 8,63; 8,70; 8,81; 8,90; 9,06; 9,24; 9,52; 10,12 byly proměřeny při optimálních průtokových rychlostech. Zaznamenaná závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na pH reakčního roztoku je zobrazena na obr. 4.5.

Jak je z grafu patrné, hodnota uvolněného chemiluminiscenčního záření je výrazně závislá na pH prostředí. Nejvyšší intenzity bylo dosaženo při pH 9,06. V ostatních případech závislost intenzity i stabilita signálu v čase klesaly. Při optimálním pH 9,06 bylo také pozorováno, že došlo k úplnému rozpuštění luminolu v uhličitanovém pufru. Roztok byl mírně nažloutlý, čirý a na dně se objevovala nerozpuštěná sedimenta, kterou bylo potřeba přefiltrovat. Při tomto pH také nebyla pozorována sraženina ani výrazná změna barvy roztoku po reakci s peroxidem vodíku.

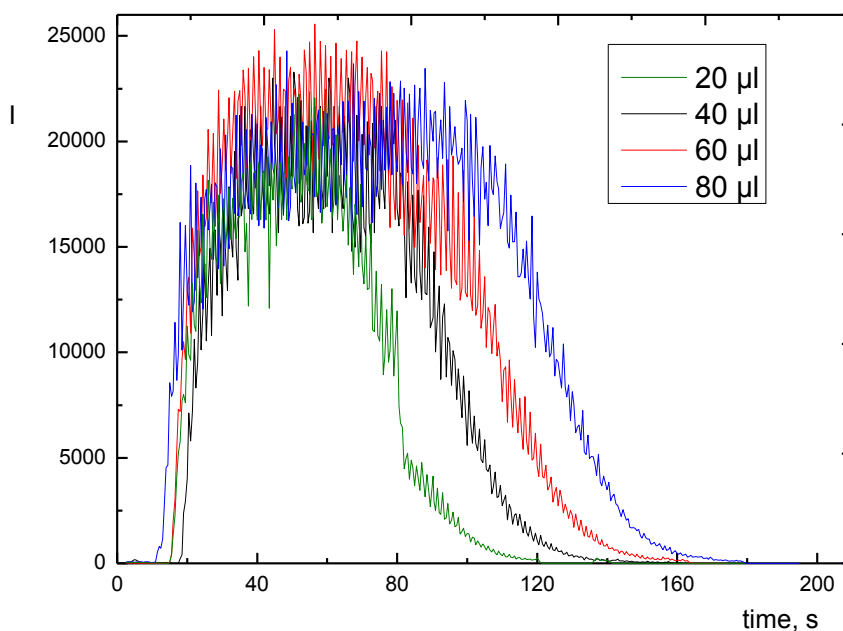


Obr. 4.5: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na pH

$V_{(\text{Co}^{2+})} = 60 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$; $c_{(\text{Co}^{2+})} = 1000 \text{ mg.l}^{-1}$, 0,5% H_2O_2 ,
 $v_{(\text{lum})} = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 6,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{Co}^{2+})} = 0,2 \text{ ml.min}^{-1}$, $t_{\text{intg.}} = 500 \text{ ms}$

4.2.4. Optimalizace dávkovaného objemu vzorku

Poslední částí optimalizací průtokového systému bylo nalézt nejvhodnější objem dávkovaného vzorku do proudu nosné kapaliny. Proměřeno bylo 5 objemů (20; 40; 60; 80 a 100 μl). Zaznamenané výsledky je možné vidět na obr. 4.5. Pro další měření byl, vzhledem ke stabilitě a dostatečné intenzitě signálu, vybrán jako optimální objem dávkovaného vzorku 40 μl . Bylo pozorováno, že se zvyšujícím se objemem dávkovaného analytu roste doba trvání analýzy, avšak hodnot dosažené intenzity chemiluminiscenční reakce se již výrazně nezvyšovala. Například pro objem 100 μl se pohybovala doba analýzy okolo 3 minut. S tímto a vyššími objemy se proto dále neuvažovalo.

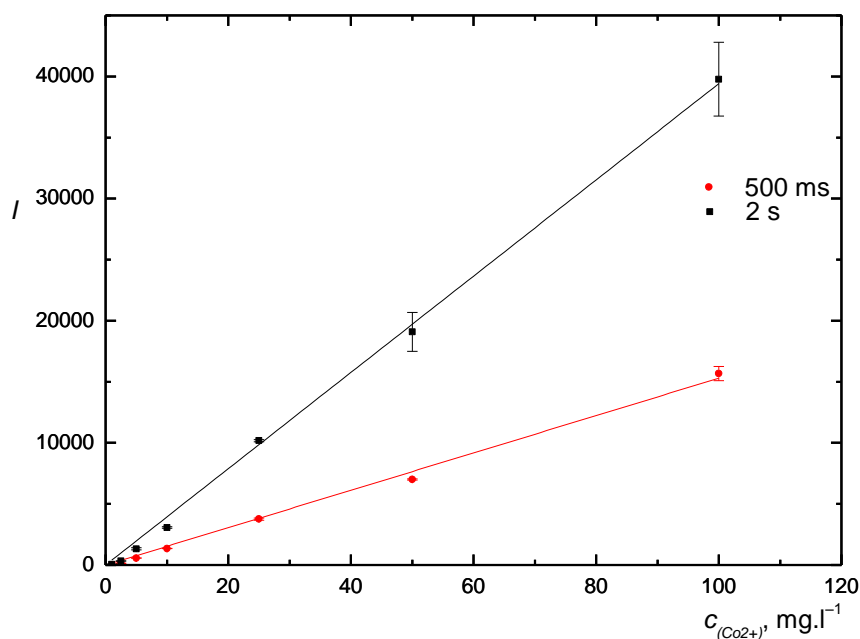


Obr. 4.6: Časová závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na dávkovaném objemu roztoku Co^{2+}
 $c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$; $c_{(\text{Co}^{2+})} = 1000 \text{ mg.l}^{-1}$, $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$, $v_{(\text{lum})} = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 6,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{Co}^{2+})} = 0,2 \text{ ml.min}^{-1}$, $t_{\text{intg.}} = 500 \text{ ms}$

4.2.5. Kalibrační závislost stanovení Co^{2+} technikou FIA

Než bylo zahájeno měření kalibrační závislosti, byla aparatura a průtoková detekční cela rozebrána a důkladně vyčištěna. Křemenné okénko detektoru bylo vyleštěno buničinou. Tento postup byl zařazen proto, aby bylo dosaženo co nejlepších podmínek ke kalibraci. Na základě předchozích optimalizačních kroků byly vybrány optimální parametry stanovení: $V_{(\text{Co}^{2+})} = 40 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$; $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$, $v_{(\text{lum})} = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 6,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{Co}^{2+})} = 0,2 \text{ ml.min}^{-1}$.

Byly proměřeny roztoky Co^{2+} o koncentracích 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100 a 500 mg.l^{-1} . Z třech naměřených hodnot pro jednotlivé koncentrace byl vybrán medián a vypočtena směrodatná odchylka. Následně byly hodnoty lineární části kalibrační závislosti vyneseny do grafu na obr. 4.7. Z grafu je vidět, že rozebráním a důkladným pročištěním aparatury bylo dosaženo mnohem vyšších hodnot intenzity chemiluminiscenčního záření, než tomu bylo u jednotlivých optimalizačních kroků. Proto by bylo vhodné tento proces provádět pravidelně po určité sérii měření, aby bylo dosaženo stále stejné citlivosti. Kalibrační závislost byla proměřena při dvou integračních časech. Jelikož emise chemiluminiscenčního záření trvala poměrně dlouho, bylo možné prodloužit integrační čas na 2 s. To zajistilo vyšší citlivost stanovení, protože detektor během 2 s sbíral data, která byla poté vyhodnocena příslušným softwarem.



Obr. 4.7: Kalibrační závislost intenzity chemiluminiscenčního záření

$V_{(Co2+)} = 40 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{(lum)} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $pH = 9,0$; $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$, $v_{(lum)} = 1,0 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $v_{(H_2O_2)} = 6,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(Co2+)} = 0,2 \text{ ml.min}^{-1}$

Proměřením kalibrační závislosti byly určeny základní charakteristiky stanovení. Opakovatelnost byla vypočtena z deseti měření roztoku Co^{2+} o koncentraci 5 mg.l^{-1} . Citlivost je dána směrnicí kalibrační závislosti. Jak je patrné z obr. 4.7, zvýšení integračního času vedlo k očekávanému výraznému zvýšení citlivosti stanovení.

Tab. 4.1: Charakteristiky stanovení v případě integračního času 500 ms a 2s

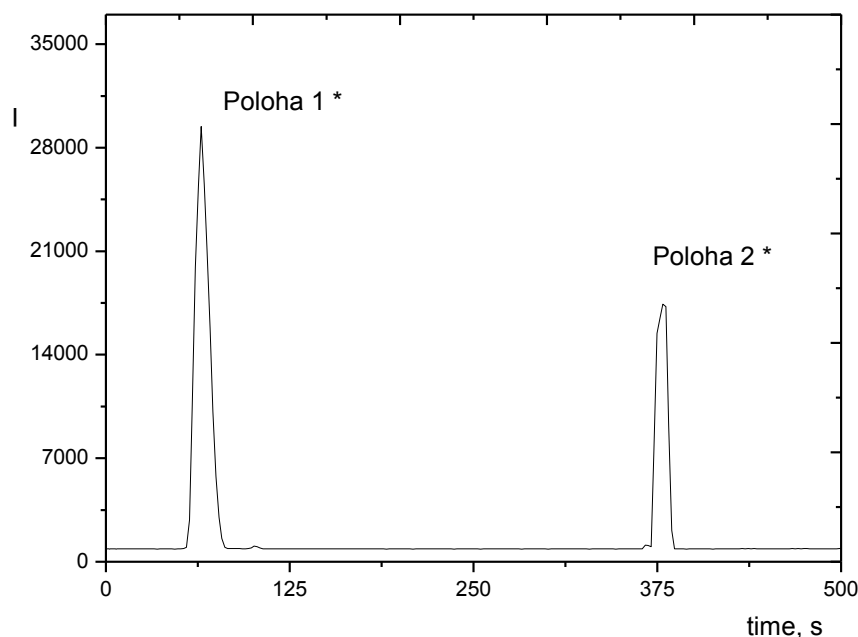
Charakteristika	$t_{\text{intg}} = 500 \text{ ms}$	$t_{\text{intg}} = 2\text{s}$	Jednotky
Mez detekce	44	55	$\mu\text{g.l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	147	183	$\mu\text{g.l}^{-1}$
Opakovatelnost (% RSD)	0,50	2,59	%
Koeficient determinace	0,9874	0,9987	
Citlivost	104,1	394,2	l.mg^{-1}

4.3. Stanovení Co^{2+} pomocí SIA techniky

Při FIA uspořádání byly zjištěny optimální podmínky stanovení Co^{2+} za účelem stanovení vitamínu B_{12} . V další části práce byla využita SIA technika, která umožňuje přesné dávkování objemů reagentů potřebných ke stanovení. Výhodou také je, že díky vyvinutému zpětnému toku dochází k dokonalejšímu mísení reagentů a pomocí programu lze nastavit reakční čas potřebný k proběhnutí reakce. Obecně vede využití SIA techniky ke zlepšení reprodukovatelnosti.

V první řadě bylo nutné rozhodnout, do jaké ze dvou možných poloh určených pro umístění detektoru (optického vlákna) v těle osmicestného selekčního ventilu bude vhodné napojit optické vlákno detektoru (obr. 3.4.). Byly vyzkoušeny obě možnosti zapojení optického vlákna. Pro jednotlivé polohy byl zaznamenán signál, který je možné vidět na obr. 4.8. Z grafu je zřejmé, že jako optimální se jeví zavést optický kabel do horní polohy tj. č.1. Výrazně vyšší intenzita může být způsobena delší optickou drahou a tím zachycení většího objemu luminiscenčního roztoku emitujícího záření, který protéká průtokovou celou.

Integrační čas pro všechna měření v SIA zapojení byl nastaven na hodnotu 2 s. A to z již dříve zmíněného důvodu. V případě FIA uspořádání bylo při tomto integračním čase dosaženo vyšší citlivosti stanovení a tedy i nižších limitů detekce, jak je možné vidět na obr. 4.7.



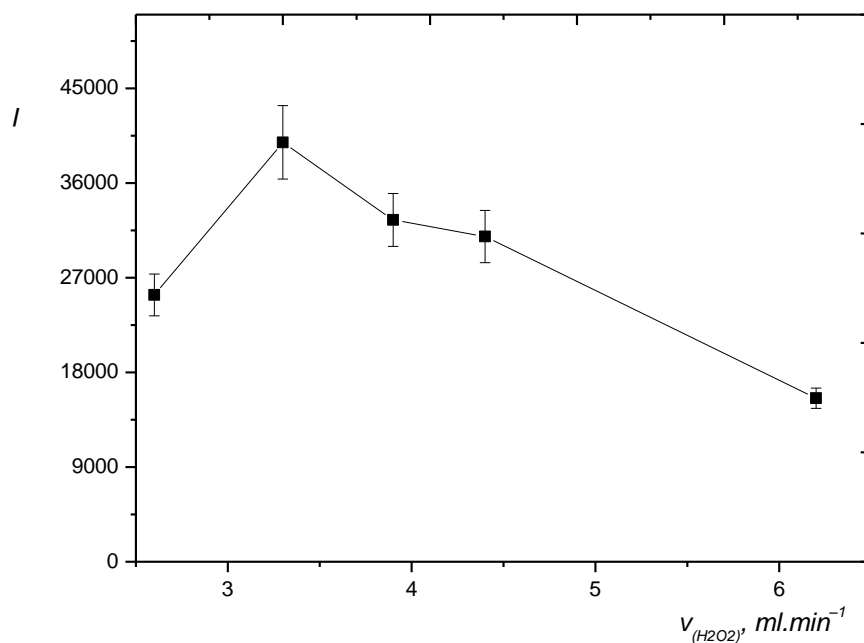
Obr. 4.8: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na umístění detektoru

$t_{\text{intg.}} = 2\text{s}$, $V_{(\text{Co}^{2+})} = 300\ \mu\text{l}$; $V_{(\text{lum})} = 300\ \mu\text{l}$; $c_{(\text{lum})} = 16,9\ \text{mmol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$;
 $c_{(\text{Co}^{2+})} = 500\ \text{mg.l}^{-1}$, $0,5\% \text{H}_2\text{O}_2$, $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 3,3\ \text{ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{lum}+v_z)} = 1,5\ \text{ml.min}^{-1}$

* Polohy na osmicestném selekčním ventilu dle obr. 3.4.

4.3.1. Optimalizace průtoku H_2O_2

Peroxid vodíku je v tomto uspořádání dávkován kontinuálně pomocí peristaltického čerpadla ihned poté, co se selekční ventil přepne do polohy, kdy je reakční směs s roztokem Co^{2+} transportována do detekčního prostoru osmicestného selekčního ventilu. Množství přiváděného H_2O_2 bylo regulováno pomocí změn vnitřního průměru tygonové hadičky. Byly proměřeny hadičky o průměru 0,59; 0,76; 0,89; 1,02 a 1,42 mm, což odpovídá průtokovým rychlostem 2,6; 3,3; 3,9; 4,4 a 6,2 ml.min^{-1} . K dalším analýzám byla vybrána hadička o průměru 0,76 mm, jak je vidět z grafické závislosti na obr 4.9. Je možné, že díky průměru hadičky tj. 0,76 mm a tedy průtokové rychlosti H_2O_2 3,3 ml.min^{-1} dochází k úplné oxidaci luminolu. Dalším důvodem maximální hodnoty (nižší průtoková rychlost H_2O_2) signálu může být delší setrvání reakční směsi v optické dráze.



Obr. 4.9: Závislost intenzit chemiluminiscenčního záření na rychlosti přiváděného H_2O_2

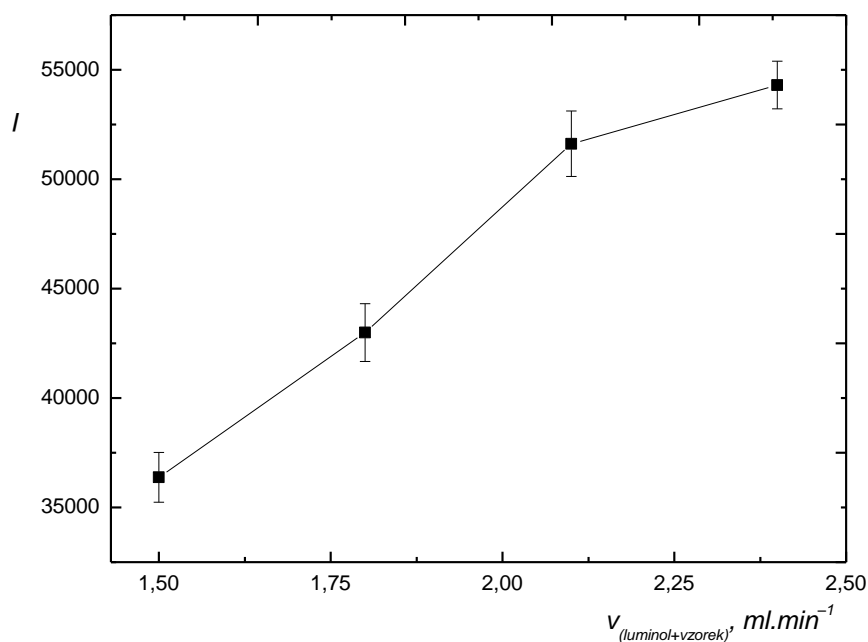
$t_{intg.} = 2 \text{ s}$, $V_{(Co^{2+})} = 300 \text{ } \mu l$; $V_{(lum)} = 300 \text{ } \mu l$; $c_{(lum)} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $pH = 9,0$;
 $c_{(Co^{2+})} = 50 \text{ mg.l}^{-1}$, $0,5\% H_2O_2$, $v_{(vz+lum)} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$

Na základě chybových úseček z obr. 4.9. je patrné, že naměřené hodnoty značně kolísaly. Stanovení analytu by bylo zatíženo větší chybou. Zmíněný nedostatek byl odstraněn zařazením promývacího kroku. K promývání byl využit roztoku $0,5\% H_2O_2$. Zařazení promývacího kroku se ukázalo být správné. Došlo ke zvýšení signálu a zlepšení opakovatelnosti stanovení. Proto byl dále zařazen mezi jednotlivé analýzy. Doba promývání činila 5 s. Při použití koncentrace Co^{2+} 1000 mg.l^{-1} poté docházelo k přesvícení detektoru (při integračním čase 2 s). Totéž bylo pozorováno i u koncentrace Co^{2+} 500, 250 a 100 mg.l^{-1} . K další optimalizacím tak byla vybrána koncentrace 50 mg.l^{-1} .

V porovnání s průtokovou rychlostí H_2O_2 ve FIA uspořádání je v SIA uspořádání téměř 2 krát nižší. To může být vysvětleno tím, že dochází k přesnému nasávání reagentů a k jejich dostatečnému promíchání a úplnému proběhnutí oxidace luminolu v detekčním prostoru.

4.3.2. Optimalizace průtoku směsi luminol + Co^{2+}

Byla proměřena rychlost průtoku reakční směsi luminolu a roztoku Co^{2+} průtokovou celou směrem k detektoru. Byly proměřeny průtokové rychlosti 1,5; 1,8; 2,1 a 2,4 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Jako optimální byla vybrána hodnota 40 $\mu\text{l} \cdot \text{sec}^{-1}$, což odpovídá rychlosti průtoku 2,4 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



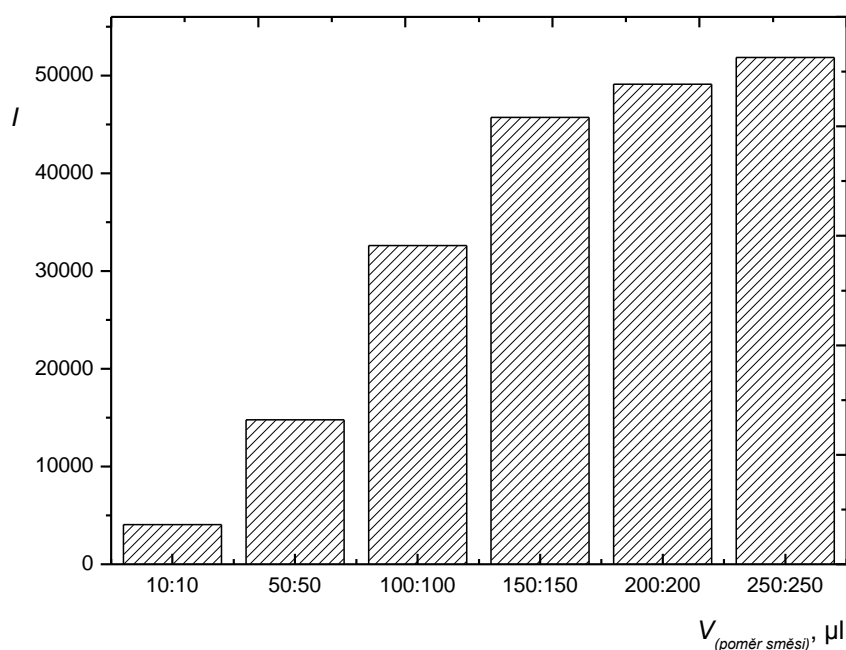
Obr. 4.10: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na průtokové rychlosti směsi luminolu a Co^{2+}

$t_{\text{intg.}} = 2 \text{ s}$, $V_{(\text{Co}^{2+})} = 300 \mu\text{l}$; $V_{(\text{lum})} = 300 \mu\text{l}$, $c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$;
 $c_{(\text{Co}^{2+})} = 50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$, $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 3,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Z obr. 4.10 je vidět, že se stoupající hodnotou průtoku směsi luminolu a Co^{2+} k detektoru roste také intenzita chemiluminiscenčního záření. Reakční směs se do prostoru detektoru, kde je zároveň přiváděn H_2O_2 , dostává rychleji. A již zreagovaná směs tak může v kratším časovém intervalu odtéci do odpadu. V detekčním prostoru může být rychleji nahrazena ještě nezreagovanou reakční směsí.

4.3.3. Optimalizace objemů reagentů

Nedílnou součástí optimalizací v SIA uspořádání je nalezení optimálních objemů reakčních činidel mísících se v zadržovací cívce. V tomto případě bylo potřeba optimalizovat objemy pouze luminolu a vzorku (roztoku Co^{2+}). Nejprve byly vyzkoušeny objemy reagentů v poměru 1:1 pro objemy 10:10; 50:50; 100:100; 150:150; 200:200; 250:250 μl obr. 4.11. Byl pozorován nárůst intenzity s narůstajícím objemem činidel. Proto byly dále vyzkoušeny již výše zmíněné poměry objemů reakčních činidel, jak je vidět na obr. 4.12.

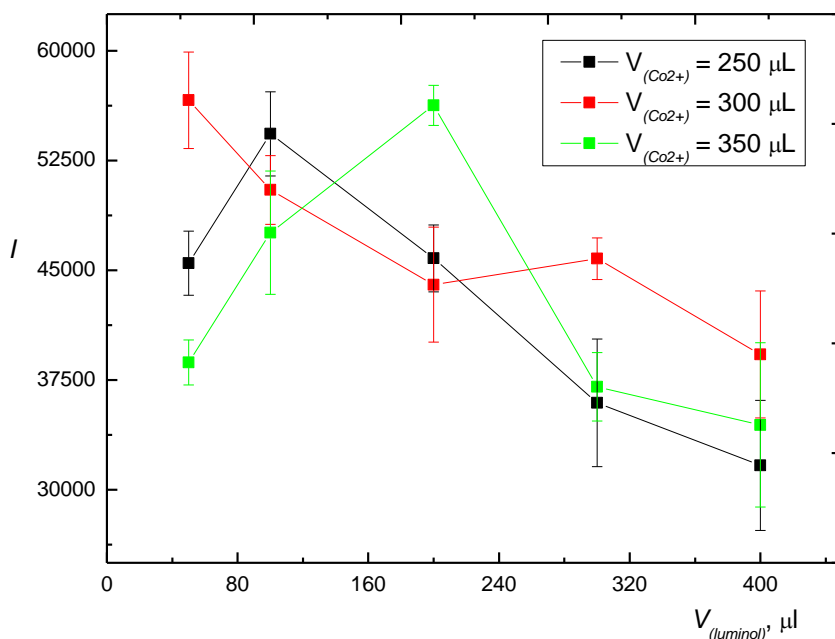


Obr. 4.11.: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na dávkovaných poměrech objemů luminolu a Co^{2+}

$c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$; $c_{(\text{Co}^{2+})} = 50 \text{ mg.l}^{-1}$, $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$, $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 3,3 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $v_{(\text{vz}+\text{lum})} = 2,4 \text{ ml.min}^{-1}$

Z obr. 4.11 je vidět, že se zvyšujícím objemem luminolu a roztoku Co^{2+} roste intenzita chemiluminiscence. Je tedy zřejmé, že množství luminolu koreluje s množstvím Co^{2+} přítomným v roztoku. Jak je zmíněno v kap. 2.6, Co^{2+} katalyzuje oxidační reakci luminolu H_2O_2 . K tomu, aby bylo dosaženo vysoké intenzity chemiluminiscence příslušné reakce, bude potřeba, aby směs obsahovala dostatečné

množství luminolu, jako substrátu, a příslušné množství Co^{2+} , jako katalyzátoru. V dalším kroku byly ke třem objemům (250, 300 a 350 μl) vzorku (Co^{2+}) testovány různé objemy luminolu (50, 100, 200, 300 a 400 μl). Výsledné závislosti jsou vidět na obr. 4.12.



Obr. 4.12: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na dávkovaných objemech reakčních činidel luminolu a roztoku Co^{2+}

$t_{\text{intg.}} = 2 \text{ s}$, $c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$; $c_{(\text{Co}^{2+})} = 50 \text{ mg.l}^{-1}$, $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$,
 $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 3,3 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{lum}+\text{Co}^{2+})} = 2,4 \text{ ml.min}^{-1}$

Jako optimální byl pro další měření vybrán objem luminolu 100 μl a objem roztoku Co^{2+} 250 μl . Tento poměr byl vybrán vzhledem ke spotřebě luminolu, jakožto finančně nákladnější položky a také proto, že hodnota intenzity tohoto poměru se výrazně neliší od zbývajících poměrů objemů.

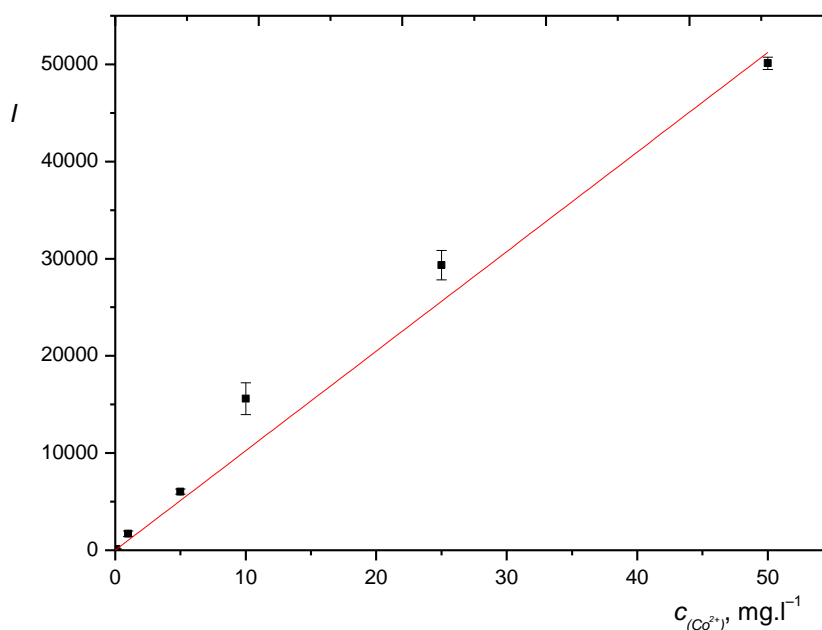
4.3.4. Optimalizace zadržovacího času

Další součástí optimalizace techniky SIA bylo studium vlivu doby pobytu reakčních činidel v zadržovací cívce, kde dochází k jejich mísení, na intenzitě získané chemiluminiscence. Bylo proto provedeno sedm měření po třech opakováních, kdy se měnila doba setrvání reagentů v zadržovací cívce. Byly proměřeny časy: 0; 2; 3; 5; 7; 10

a 15 s. Hodnoty intenzit z jednotlivých měření byly zprůměrovány a mezi sebou porovnány. Závěrem měření bylo, že doba, po kterou jsou reagenty přítomné v zadržovací cívce, neovlivňuje intenzitu chemiluminiscence. Dalo by se to vysvětlit tak, že se jedná o reakci luminolu s H_2O_2 katalyzovanou iontem Co^{2+} přítomným v roztoku. V zadržovací cívce tak neprobíhá žádná chemická reakce ani nevznikají žádné reakční produkty či meziprodukty. Dochází pouze k promísení reagentů. Následná reakce, jejímž důsledkem je chemiluminiscenční záření, probíhá až při smísení této směsi s H_2O_2 .

4.3.5. Kalibrační závislost

Po ukončení optimalizačních experimentů bylo přistoupeno k proměření kalibrační závislosti stanovení Co^{2+} technikou SIA. Byly připraveny a za optimálních podmínek proměřeny roztoky Co^{2+} o koncentracích 0,01; 0,1; 1,0; 5,0; 10; 25 a 50 mg.l^{-1} .¹ Výslednou kalibrační závislost je možné vidět na obr. 4.13.



Obr. 4.13: Kalibrační závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na koncentraci roztoku Co^{2+}

$t_{\text{intg.}} = 2\text{s}$, $V_{(\text{Co}^{2+})} = 250\ \mu\text{l}$; $V_{(\text{lum})} = 100\ \mu\text{l}$; $c_{(\text{lum})} = 16,9\ \text{mmol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$; $0,5\% \text{H}_2\text{O}_2$,
 $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 3,3\ \text{ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{lum} + \text{Co}^{2+})} = 2,4\ \text{ml.min}^{-1}$

Jako blank byl použit signál roztoku, který obsahoval nulové množství iontů Co^{2+} . Signál blanku se pohyboval v hodnotách okolo $2424,2 \pm 6,9$. Přítomnost signálu mohla být způsobena tím, že i bez přítomnosti katalyzátoru reakce probíhá z části samovolně. Díky přítomnosti katalyzátoru probíhá reakce kvantitativně. Bylo provedeno 10 měření signálu blanku. Průměr z měření byl zaokrouhlen na 2424. Hodnota blanku byla odečtena od všech naměřených hodnot. Pro kalibraci byly vyzkoušeny nižší koncentrace roztoků Co^{2+} , ale nebylo již možné rozlišit signál od signálu blanku. Charakteristika kalibrační závislosti SIA stanovení je v tab. 4.2. Porovnáním hodnot charakteristik uvedených v tabulkách 4.1 a 4.2 je patrné, že pomocí SIA techniky bylo možné dosáhnout nižších mezí detekce a vyšší citlivosti pro stanovení kobaltu. Mez detekce se snížila u SIA uspořádání přibližně na polovinu, citlivost stanovení u SIA uspořádání vzrostla přibližně trojnásobně, což představuje významné zlepšení.

Tab. 4.2: Charakteristiky SIA stanovení

Charakteristika	Hodnoty	Jednotky
Mez detekce	25	$\mu\text{g.l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	83,4	$\mu\text{g.l}^{-1}$
Opakovatelnost (% RSD)	4,5	%
Koeficient determinace	0,9938	
Citlivost	1024,3	l.mg^{-1}

4.4. Rozklad a stanovení vitamínu B_{12}

V předchozích částech byly vypracovány a charakterizovány metody stanovení Co^{2+} pomocí dvou technik průtokové analýzy (FIA a SIA). Následně byla pozornost věnována možnostem vyvázání iontu Co^{2+} z molekuly vitamínu B_{12} . V rámci tohoto úkolu byly vyzkoušeny různé způsoby rozkladu preparátu vitamínu B_{12} . Kapsule kapalné formy vitamínu B_{12} měla koncentraci $300 \mu\text{l.ml}^{-1}$. Hlavním úkolem rozkladu bylo vyvázat ze struktury kobalaminu Co^{2+} iont, který následně slouží jako katalyzátor

oxidační reakce luminolu a H_2O_2 . Reakce probíhá v optimálním pH roztoku tj. pH 9. Předběžné experimenty s rozklady byly provedeny a proměřeny již ve FIA uspořádání. Byl vyzkoušen také rozklad reálných pevných vzorků tohoto vitamínu o koncentraci 100 μg v jedné tabletě. Aby bylo dosaženo potřebné koncentrace kobalaminu v roztoku, bylo nutné rozpustit okolo 25 tablet vitaminového preparátu v destilované vodě. S určitostí však není možné říci, zdali se všechny kobalamin uvolnil do roztoku a ze své struktury po provedení rozkladu uvolnil ionty Co^{2+} . Po rozpuštění tablet na dně odměrné baňky zůstala sediment nerozpustných pojiv. Proto bylo nutné před provedením samotného rozkladu roztok přefiltrovat. Po přefiltrování roztoku byly vyzkoušeny veškeré rozklady, které byly zmíněny v kap. 2.7. Po provedení všech rozkladů pevného přípravku vitamínu B_{12} ve FIA uspořádání byla naměřena nulová odezva chemiluminiscence. Rozklady ampulí s tekutým vitaminem B_{12} pomocí FIA techniky byly také bez odezvy. To mohlo být způsobeno jak nízkou citlivostí FIA stanovení, tak nízkou účinností rozkladu.

Rozklady vitamínu B_{12} v SIA uspořádání jsou detailně zmíněny v kap. 4.4.1. Na základě vyšší citlivosti SIA stanovení bylo již možné detekovat intenzitu chemiluminiscence a zjistit účinnost jednotlivých rozkladů.

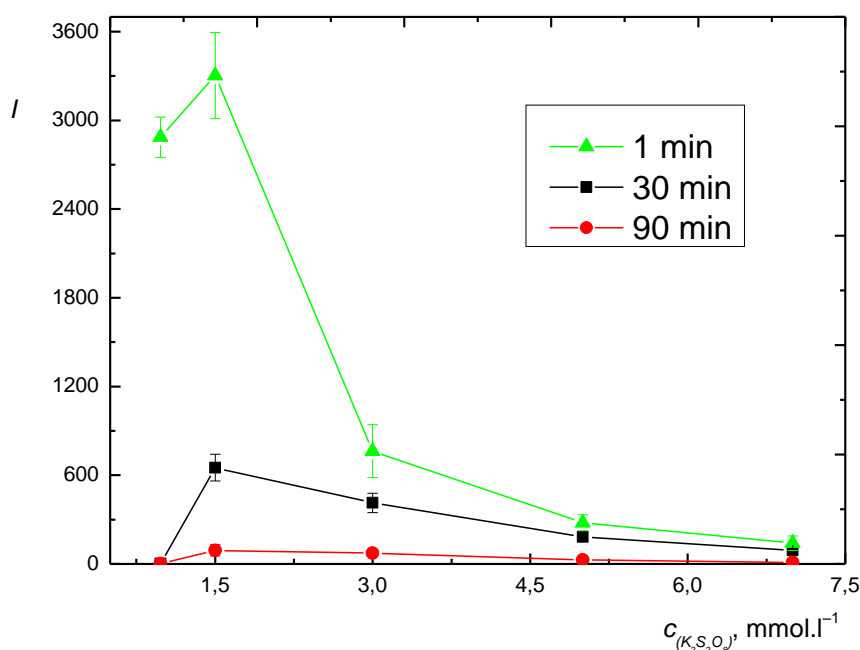
Obsah vitamínu B_{12} byl vypočten z rovnice kalibrační závislosti. Pokud došlo k ředění, byl výsledek vynásoben zředovacím faktorem.

4.4.1. Rozklad na mokré cestě

Postup tohoto typu rozkladu vitamínu B_{12} je popsán v kap. 2.7.4. Nejprve byl vyzkoušen na pevné formě vitamínu B_{12} , protože zaručil nejen úplné rozložení molekuly vitamínu B_{12} , ale i pojiv, která jsou součástí pevného preparátu. Do teflonové nádoby bylo naváženo okolo 0,5 g rozdrceného vitaminového preparátu. K tomu bylo přidáno 4,0 ml 65 % HNO_3 a 2,0 ml 30% H_2O_2 . Použitím předem nastaveného programu činila doba rozkladu vzorku okolo 4 hodin. Ani díky tomuto způsobu rozkladu nebyla detekována žádná hodnota intenzity chemiluminiscence. Což může být způsobeno velmi nízkým pH směsi. Vzhledem k tomu, že analytická chemie směřuje k úspoře času, snížení spotřeb reakčních činidel a zmenšení ekologické zátěže, je tento způsob rozkladu nevyhovující. Proto nebyl dále využíván k rozkladu kapalných forem preparátu vitamínu B_{12} .

4.4.2. Rozklad s $K_2S_2O_8$ a UV zářením

Byl smíchán 1,0 ml kapalné formy vitaminu B_{12} o koncentraci $300 \mu\text{l.ml}^{-1}$ s 2,0 ml roztoku $K_2S_2O_8$ o koncentracích 0,5; 0,98; 1,5; 2,0 3,0; 4,5; 5,0 a $7,0 \text{ mmol.l}^{-1}$. Směs byla řádně promíchána a vložena na 1; 30 a 90 minut pod UV lampu. Radikály vzniklé pod UV zářením narušují strukturu molekuly vitaminu B_{12} a tedy přispívají k uvolnění iontu Co^{2+} . Jelikož není přesně znám radikálový mechanismus, není proto možné s určitostí říci jaké meziprodukty a produkty během reakce vznikají a s jakou účinností rozkládají strukturu komplexu vitaminu B_{12} .



Obr. 4.14: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci $K_2S_2O_8$ a době ozařování

$V_{(Co^{2+})} = 250 \mu\text{l}$; $V_{(lum)} = 100 \mu\text{l}$; $c_{(lum)} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $pH = 9,0$; $0,5\% H_2O_2$,
 $v_{(H_2O_2)} = 3,3 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(vz+lum)} = 2,4 \text{ ml.min}^{-1}$

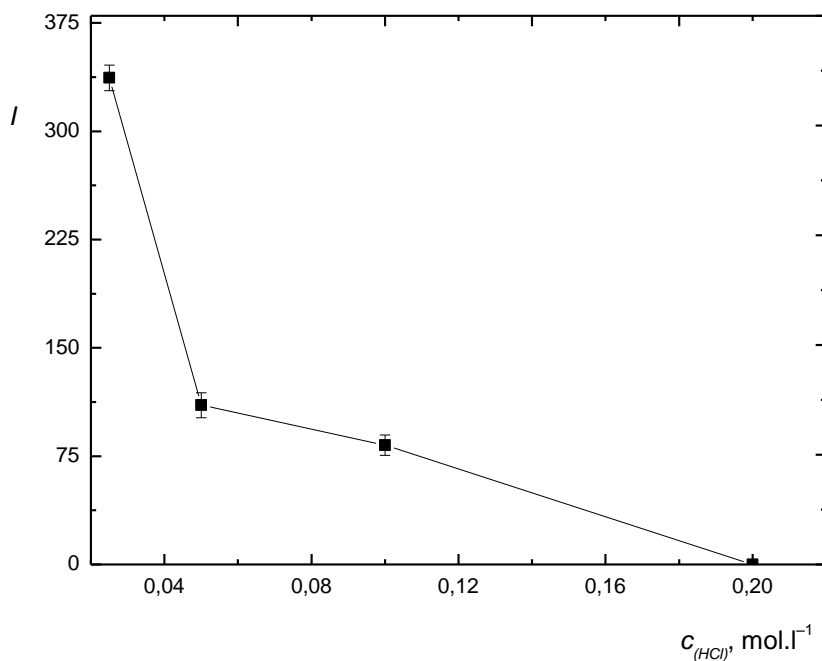
Z grafu je možné pozorovat, že se zvyšující se dobou ozařování klesá hodnota intenzity chemiluminiscence a tedy i množství uvolněného iontu Co^{2+} . Toto je možné si vysvětlit vznikem produktů, které mohou ve své struktuře opět vázat iont Co^{2+} . Nejvyšší výtěžnost byla získána s využitím koncentrace $K_2S_2O_8$ $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ s dobou ozařování 1 minutu, která činila 74,43 %.

4.4.3. Rozklad s HNO_3

K 1,0 ml vzorku bylo přidáno 5,0 ml koncentrované HNO_3 . Směs byla odpařena do sucha. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo k reziduu přidáno 2,0 ml destilované vody. Následně bylo vše proměřeno. Naměřená hodnota intenzity se pohybovala 1832 ± 100 . Výtěžnost se v tomto případě pohybovala okolo 27,52 %. Což v porovnání s předchozím rozkladem je téměř 3 krát menší.

4.4.4. Rozklad s HCl

Bylo smícháno 1,0 ml vzorku s 10 ml HCl o koncentracích: 0,025; 0,05; 0,1 a 0,2 mol.l^{-1} . Koncentrace jednotlivých roztoků byly připravovány ze zásobního roztoku 37% HCl . Nejvyšší výtěžnost rozkladu je, jak je vidět z grafu, v kombinaci s 0,025 mol.l^{-1} HCl . Výtěžnost činila 27,78 %.

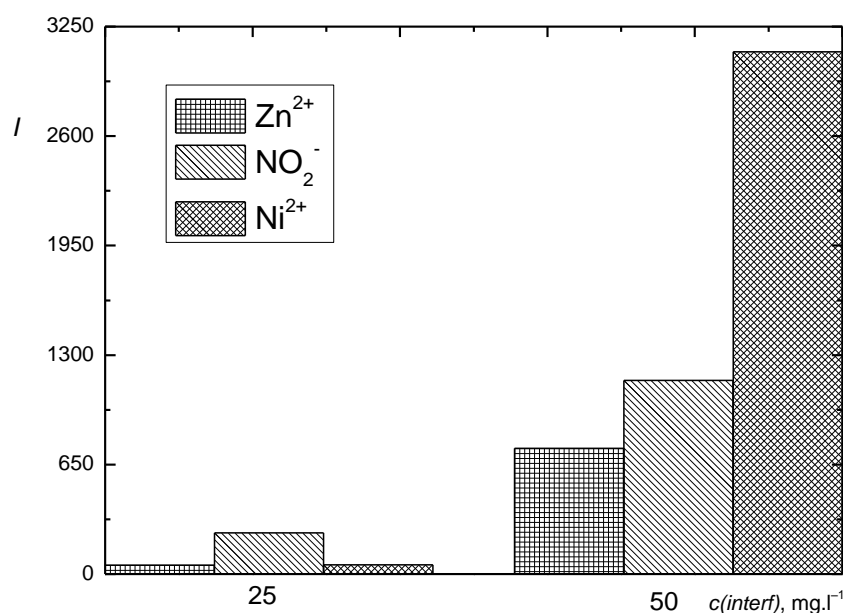


Obr. 4.15: Závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci HCl

$V_{(\text{Co}^{2+})} = 250 \mu\text{l}$; $V_{(\text{lum})} = 100 \mu\text{l}$; $c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$ $\text{pH} = 9,0$; 0,5% H_2O_2 ,
 $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 3,3 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(vz+lum)} = 2,4 \text{ ml.min}^{-1}$

4.5. Studium interferencí

V poslední části práce byla pozornost věnována interferenční studii. Za možné interferenty lze obecně považovat látky, které svými účinky, podobně jako kobalt, mohou katalyzovat oxidaci luminolu a přispívat tak ke zvýšení intenzity luminiscence. Konkrétní možné interferenty byly zmíněny v kap. 2.8. Je proto nutné zjistit, zdali přítomnost jiného iontu v reakční směsi neovlivňuje stanovení. Pro interferenční studii byly vybrány následující ionty: Na^+ , Ca^{2+} , NO_2^- , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} a ethanol. Měření vlivu interferentů na stanovení Co^{2+} probíhalo v několika fázích. Nejprve byly jako vzorky proměřeny vodné roztoky obsahující pouze zmíněné interferenční ionty (látky) na koncentračních úrovních 25 a 50 mg.l^{-1} . Bylo zjištěno, že na koncentrační úrovni 25 mg.l^{-1} pro všechny vybrané ionty byla pozorována velmi nízká intenzita záření, jejíž hodnota se pohybovala okolo 75 ± 36 . To vypovídá o tom, že na této koncentrační úrovni nejsou vybrané interferující ionty schopné dostatečně katalyzovat oxidační reakci luminolu. Na koncentrační úrovni 50 mg.l^{-1} byly hodnoty intenzit vyšší a tím i pro stanovení nezanedbatelné. A to pouze u iontů Ni^{2+} , Zn^{2+} a NO_2^- (obr. 4.16). Hodnota intenzity chemiluminiscence pro zmíněné ionty byla: 3100 ± 238 ; 747 ± 74 a 1150 ± 102 (pro srovnání intenzita chemiluminiscenční reakce v přítomnosti 50 ml.l^{-1} byla naměřena cca 50 000).. Poté byla připraveny a proměřeny směsi, kde se nacházel interferující iont o koncentraci 50; 100 a 250 mg.l^{-1} a stanovovaný iont Co^{2+} se stálou koncentrací 10 mg.l^{-1} (obr. 4.17). Hodnota intenzity záření pro čistý roztok Co^{2+} o koncentraci 10 mg.l^{-1} byla vždy 13121 ± 987 . Experimentální parametry během měření interferencí byly následující: integrační čas detektoru byl 2 s, objem nasávaného roztoku obsahující 10 mg.l^{-1} iontu Co^{2+} s interferujícím iont měnící koncentrací činil 250 μl , objem nasávaného luminolu o koncentraci 16,9 mmol.l^{-1} a optimálním $\text{pH} = 9,0$ byl 100 μl . K oxidaci luminolu byl jako optimální používán 0,5% H_2O_2 , který byl přiváděn rychlostí 3,3 ml.min^{-1} . Rychlost směsi luminolu a Co^{2+} přiváděné k detektoru činila 2,4 ml.min^{-1} .

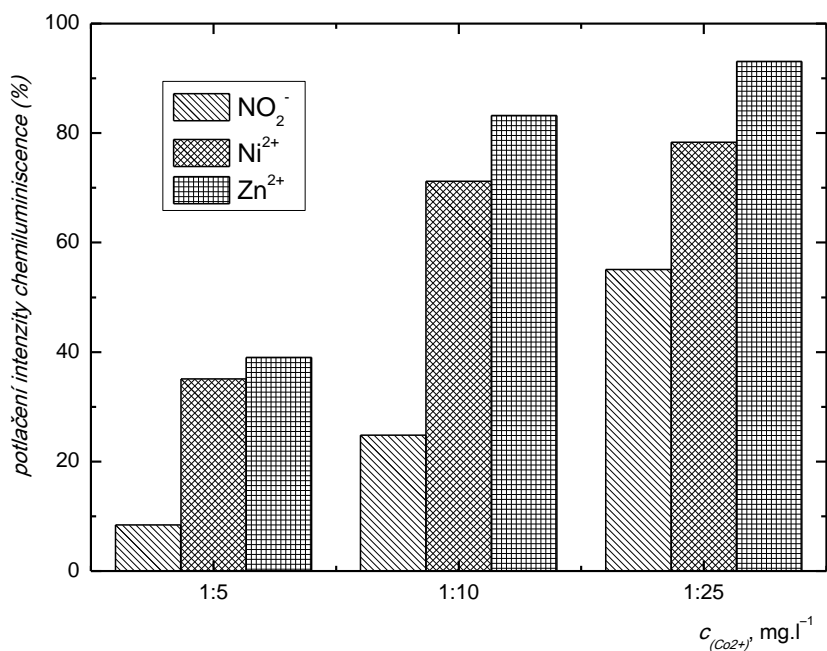


Obr. 4.16: Intenzita chemiluminiscence čistých roztoků iontů Zn^{2+} , NO_2^- a Ni^{2+} o koncentracích 25 mg.l⁻¹ a 50 mg.l⁻¹ bez přítomnosti iontů Co^{2+}
 $V_{(\text{interf})} = 250 \mu\text{l}$; $V_{(\text{lum})} = 100 \mu\text{l}$; $c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$; 0,5% H_2O_2 ,
 $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 3,3 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(vz+lum)} = 2,4 \text{ ml.min}^{-1}$

Na obr. 4.16 je vidět, že samotné ionty interferentu bez přítomnosti iontů Co^{2+} katalyzují oxidaci luminolu s nízkou hodnotou intenzity chemiluminiscence. Výrazná chemiluminiscence se v tomto případě projevuje až od koncentrace 50 mg.l⁻¹. Porovnáme-li dosažené hodnoty intenzit chemiluminiscence způsobené interferujícími ionty a stejnou koncentrací kobaltu, zjistíme, že hodnoty intenzit jsou v případě interferujících iontů výrazně nižší (cca 10-50x).

Po přidavku jednoho z výše zmíněných interferujících iontů k roztoku Co^{2+} dochází k poklesu intenzity záření. To může být způsobeno tím, že interferující iont sám o sobě katalyzuje přednostně reakci luminolu s peroxidem vodíku, ale s velmi malou účinností současného uvolnění chemiluminiscenčního záření (dává nízkou intenzitu chemiluminiscence, obr. 4.16 a srovnání s intenzitou pro stejnou koncentraci Co^{2+}). Znemožní tak iontům Co^{2+} katalyzovat reakci v plném rozsahu a proto je hodnota intenzity chemiluminiscence výrazně nižší. Velikost potlačení intenzity chemiluminiscence v přítomnosti interferujícího iontu je možné vidět na obr. 4.17.

Velikost potlačení je zde vyjádřeno v procentech. Z obr. 4.17 je vidět, že ionty NO_2^- nejméně potlačují signál, zatímco ionty Zn^{2+} jej potlačují nejvýrazněji. Jako poslední byla vyzkoušena interference ethanolu. Byl připraven roztok Co^{2+} 10 mg.l^{-1} s přidavkem čistého ethanolu v poměru 1:1. Výsledkem bylo zjištění, že přidavek ethanolu nijak neovlivňuje stanovení Co^{2+} .



Obr. 4.17: Procentuální vyjádření potlačení intenzity chemiluminiscence na přítomnosti interferujících iontů v určitém poměru ke koncentraci roztoku Co^{2+}

$t_{\text{intg.}} = 2 \text{ s}$, $V_{(\text{interf}+\text{Co}^{2+})} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $V_{(\text{lum})} = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{(\text{lum})} = 16,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $c_{(\text{Co}^{2+})} = 10,0 \text{ mg.l}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$; $0,5\% \text{ H}_2\text{O}_2$, $v_{(\text{H}_2\text{O}_2)} = 3,3 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{(\text{vz}+\text{lum})} = 2,4 \text{ ml.min}^{-1}$

5. ZÁVĚR

Jeden z hlavních cílů této diplomové práce bylo vypracovat metodu stanovení vitamínu B₁₂ reakcí s luminolem a peroxidem vodíku v průtokovém uspořádání s využitím FIA a SIA techniky. To bylo přes řadu komplikací úspěšně splněno.

Bylo nalezeno vhodné složení reakčního roztoku, který poskytoval relativně stabilní a vysoce intenzivní chemiluminiscenci za katalýzy iontů Co²⁺.

Podařilo se sestavit FIA aparaturu odpovídající požadavkům stanovení, která také řešila problém s nedokonalým mísením reakční směsi s roztokem Co²⁺.

Proměření kalibračních závislostí jak u FIA, tak SIA techniky bylo podmíněno nastavením optimálních průtokových rychlostí jednotlivých reagentů účastnících se reakce.

Nedílnou součástí práce bylo provedení rozkladů reálných vzorků vitamínu B₁₂ k získání volných iontů Co²⁺, které jsou následně detekovány.

Konec práce je věnován studiu interferencí. Ze škály iontů byly vybrány pouze tři, které již významně ovlivňují stanovení Co²⁺ v roztoku.

Aby bylo možné porovnat citlivosti obou technik, bude potřeba zmínit charakteristiky kalibračního stanovení pro obě techniky. U FIA techniky činil LOD 55,0 µg.l⁻¹ a citlivost byla 394,2 l.mg⁻¹. Parametry kalibrační závislosti u SIA techniky byly LOD 25 µg.l⁻¹ a citlivost stanovení 1024,3 mg.l⁻¹. Na základě porovnání charakteristik kalibračních závislostí u jednotlivých průtokových technik je možné říci, že SIA stanovení je pro detekci Co²⁺ v roztoku více citlivější. Bylo dosaženo téměř srovnatelných limitů detekce, jak je uvedeno v experimentech ze kterých se vycházelo⁽⁵³⁾. Moderní analytická chemie již přinesla elegantní, levné a pro životní prostředí šetrné stanovení vitamínu B₁₂, který využívá katalytický efekt Co²⁺ přítomný v jeho struktuře, reakcí s luminolem a peroxidem vodíku. Je to technika Lab on Chip s limitem detekce 0,368.10⁻³ µg.l⁻¹, což je nesrovnatelně citlivější oproti doposud známým možnostem stanovení kobalaminu⁽⁶⁹⁾. Vzhledem k dostupné technice a typu detektoru používané k řešení této diplomové práce, není možné dojít k nižším limitům detekce.

Byly provedeny rozklady vitamínu B₁₂ za účelem získání volného Co²⁺ v roztoku. Jednotlivé rozklady byly prováděny na základě předchozích experimentů uvedených v literatuře^{(52), (53), (69), (70), (71)}. Účinnost rozkladů vitamínu B₁₂ se

v jednotlivých případech výrazně lišila. Nejvyšší účinnost rozkladu vitamínu B₁₂ bylo dosaženo v kombinaci s K₂S₂O₈ o koncentraci 1,5 mmol.l⁻¹ a dobou ozařování 1 minuta. Účinnost tohoto typu rozkladu dosáhla 74,43 %. S určitostí není možné říci, jestli stabilita komplexu vitamínu B₁₂ je tak vysoká, že jej není možné rozložit se 100% účinností, nebo je to způsobeno nevhodně volenými podmínkami jednotlivých rozkladů v kombinaci s daným experimentálním uspořádáním. V případě ostatních typů rozkladů nepřesáhla účinnost hodnotu 30 %.

Interferenční studie ukázala, že z celé řady iontů zmíněných v kap. 2.8 byly vybrány pouze ionty Ni²⁺, Zn²⁺ a NO₂⁻, které již od koncentrace 50 mg.l⁻¹ významně ovlivňují stanovení Co²⁺ v roztoku. Intenzitu chemiluminiscence nejvíc potlačují ionty Zn²⁺. V roztoku o koncentraci iontů Co²⁺ a Zn²⁺ v poměru 1:25 byla potlačena intenzita chemiluminiscence až o 93,1 %.

Závěrem lze tedy říci, že cíle diplomové práce byly splněny. Významným přínosem této práce bylo vypracování metod stanovení iontu Co²⁺ pomocí průtokových metod analýzy (FIA a SIA) s relativně nízkými mezemi detekce. V souvislosti s problematikou rozkladů vitamínu B₁₂ se dané metody stanovení Co²⁺ hodí především pro jednodušší vzorky. S přihlédnutím k výsledkům interferenční studie by vhodným vzorkem mohly být pitné, povrchové, podzemní a odpadní vody. Dosažené meze detekce u SIA uspořádání jsou na stejné úrovni, které lze dosáhnout pomocí metody AAS s plamenovou atomizací (F-AAS).

6. BIBLIOGRAFIE

1. Cerda, V.: *Flow Techniques in Analytical Chemistry Automation*. Dostupné z URL: <www.scitopics.com> [Cit. 21. 11 2012].
2. Růžicka J.; Hansen E. H.: *Analytica Chimica Acta* **78**, s. 1042-1053 A (1975).
3. Růžicka J.: *Analytical Chemistry* **55**;11, s. 145-157 (1983).
4. Steward, K.K.: *Talanta* **28**, s. 789-797 (1981).
5. Cerda, V. a další: *Talanta* **50**, s. 695-705 (1999).
6. Růžicka, J.: *Automation of Agricultural, Environmental and Industrial Chemical Assays*. Dostupné z URL: <<http://www.flowinjection.com/30.%20Principle%20%20Sequential%20Injection.html>> [Cit.:15.1.2013]
7. Whitehead, E. C.: *Continuous Flow Analysis Symposium in: Advances in automated analysis*. New York, Mediad Incorporated 1977.
8. Estela, J. M.; Cerda, V.: *Talanta* **66**, s. 307-331 (2005).
9. Růžicka, J.; Hansen, E. H.: *Flow Injection Analysis*. Wiley (1988).
10. Růžicka, J.; Marshal, L. G. D.: *Analytica Chimica Acta* **237**, s. 329-343 (1990).
11. Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P.: *Chemické listy* **93**, s. 354-359 (1999).
12. Růžicka, J.: *Flow Injection Analysis*. Ver. 4 [Disk DVD] (2009).
13. Tzanavaras, P. D.; Themelis, D. G.: *Analytica Chimica Acta* **588**, s. 1-9 (2007).
14. Mesquita, R. B. R.; Rangel, A. O. S. S.: *Analytica Chimica Acta* **648**, s. 7-22 (2009).
15. Pérez-Olmos, R. a další: *Analytica Chimica Acta* **554**, s. 1-16 (2005).
16. Guebeli, T.; Christian, G. D.; Růžicka, J.: *Analytical Chemistry* **63**, s. 2407-2413 (1991).
17. Barnett, N. W.; Lenehan, C. E.; Simon, W. L.: *Analyst* **127**, s. 997-1020 (2002).
18. Pérez-Olmos, R. a další: *Food Chemistry* **90**, s. 471-490 (2005).
19. Pimenta, A. M. a další: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**, s. 16-34 (2006).
20. Economou, A.: *Trends in Analytical Chemistry* **24**, s. 416-425 (2005).
21. Hlúbík, P.; Opltová, L.: *Vitaminy*. 1. vyd. Praha, Grada 2004.
22. Stipanuk, M. H.: *Biochemical, physiological and molecular aspects of human*. Philadelphia, Saunders, 2006.

23. Gropper, S. A. S.; Smith, J. L.; Groff, J. L.: *Advanced nutrition and human metabolism*. Wadsworth/Cengage Learning 2009.
24. Randaccio, L.; Geremia, S.; Wuerger, J.: *Journal of Organometallic Chemistry* **692**, s. 1198-1215 (2007).
25. Velíšek, J.: *Chemie potravin*. 2. vyd. Tábor, Osis 2002.
26. Brody, T.: *Nutritional biochemistry*. 2. vyd. San Diego, Academic Press 1998.
27. Caballero, B.; Allen, L.; Prentice, A.: *Encyclopedia of human nutrition*. 2. vyd. Amsterdam, Elsevier 2005.
28. Opletal, L.: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. 1. vyd. Praha, Karolinum 2011.
29. Velíšek, J.: *Chemie potravin*. 2. vyd. Tábor, Osis 2002
30. The Royal Society of Medicine. *Vitamin B12 Sources and Bioavailability*. Dostupné z URL: <<http://ebm.rsmjournals.com/content/232/10/1266/F1.expansion.html>> [Cit: 19. 2 2013] .
31. Gropper, S. A. S.; Smith, J. L.; Groff, J. L.: *Advanced nutrition and human metabolism*. 5. vyd. Australia, Wadsworth/Cengage Learning 2009.
32. Hodson, S. T.; Subramanian, S.; Allen, J. R.: *J. Assoc. Off. Anal.* **67**, s. 994-998 (1984).
33. Watanabe, F.: *Experimental Biology and Medicine* **10**, s. 232 (2007).
34. Bowmann, B. a Russel, R. M.: *Present knowledge in nutrition*. 8. vyd. Wahington, ILSI Press 2001.
35. Mahan, L. K. a další: *Krause's food and nutrition therapy*. 12. vyd. St. Louis, Saunders/Elsevier 2008.
36. Combs, G. F.: *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 1.vyd. Burlington, Elsevier Academic Press 2008.
37. Varela-Moreiras, G.; Murphy, M. M.; Scott, J. M.: *Nutrition Reviews®* **67**, s. 69-72 (2009).
38. Herrmann, W. a další: *Am J Clin Nutr* **78**, s. 131-136 (2003).
39. de Meer, K.; Finglas, P. M.; Molloy, A.: *Eur J Clin Nutr* **34**, s. 187-193 (2005).
40. Sakai, T.; Suzui, .M; Higuchi, H.: *Anal. Sci.* **13**, s. 131 (1997).
41. Viñas, P. a další: *Anal. chim. Acta.* **318**, s. 319 (1996).
42. Refera, T.; Chandranvanshi, B. S.; Alemu, H.: *Electroanalysis.* **10**, s. 1038(1998).

43. Giroussi, S. T.; Voulgaropouls, A. N.; Golimowski, J.: *Chem. Anal.* **42**, s. 589 (1997).
44. Spanos, S.; Wahrman, M. Z.; Sharma, G. M.: *Anal Biochem.* **289**, s. 68 (2001).
45. Indyk, H. E. a další: *AOAC Int.* **85**, s. 72 (2002).
46. González, L.; Yuln, G.; Volonté, M.G.: *J Pharm Biomed Anal.* **20**, s. 487 (1999).
47. Stefova, M. a další: *Anal Lett.* **30**, s. 2723 (1997).
48. Baker, S. A.; Miller-Ihli, N. J.: *Spectrochim Acta.* **55** Part B, s. 1823 (2000).
49. Watanabe, F. a další.: *J Agric Food Chem.* **4661**, s. 45 (1997).
50. Lin, Q.; Guiraúm, A.; Escobar R.: *Anal Chim Acta.* **283**, s. 379-385 (1993).
51. Zhang, S.; Wu, Y.; Li, H.: *Talanta.* **53**, s. 609-616 (2000).
52. Song, Z.; Hou, S.: *Anal. Chim. Acta.* **488**, s. 71-79 (2003).
53. Murillo Pulgarín, J. A. a další.: *Luminiscence.* **26**, s. 536-542 (2011).
54. Golimowsk, J.; Golimowska, K.: *Anal Chim Acta.* **325**, s. 111-133(1996).
55. Cabon, J. Y.; Cabon, N.: *Anal Chim Acta.* **418**, s. 19-31 (2000).
56. Nascimento, P.C. a další: *Anal Lett.* **39**, s. 777-790 (2006). ,
57. Samari, F. a další: *Analytical Methods.* **4**, s. 4155-4160 (2012).
58. Pelant, I.; Valenta, J.: *Luminiscenční spektroskopie*. 1.vyd. Praha, Academia 2006.
59. Šimsa, D.; Skopal, J.: *Chem. Listy.* **102**, s. 1017-1019 (2008).
60. Barni, F. a další: *Talanta.* **72**:3, s. 896-913 (2003).
61. Blum, J. L.: *Bio- and Chemi-Luminiscence Sensors*. World Scientific 1997.
62. Lee Lerner, E. K.; Lerner, B. W.: *"Luminol" World of forensis science*. Dostupné z URL: < www.enotes.com/luminol-reference > [Cit. 12. 7 2012].
63. Dodeigne, C.; Thunua, L.; Lejeune, R.: *Talanta.* **51**, s. 415-439 (2000).
64. Isacson, U.; Kowalewska, J.; Wettermark, G.J.: *Inorg. Nucl. Chem.* **40**, s. 1653-1656 (1978).
65. Proescher, F.; Moody, A. M.: *J. Lab. Clin. Med.* **24**, s. 1183-1189 (1939).
66. Barnett, N. W.; Francis, P.S.: *Chemiluminescence: Liquid-Phase, Encyclopedia of Analytical Science*. 2. vyd. London, Elsevier Academic Press 2005.
67. White, E.H.; Bursey, M. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **86**, s. 941-942 (1964).
68. Larena, A.; Valero, M.; Bernabeu, E.: *Optica Pura Y Aplica.* **16**, s. 91-96 (1983).
69. Lok, K. S., a Muttalib, A.: *Lab Chip.* **12**, s. 2353-2361 (2012).
70. Han, L. a další: *Spectrochimica Acta.* **82**, s. 146-152 (2011).

71. Mader, P.; Čurdová, E.: *Chem. Listy*. **91**, s. 227-236 (1997).
72. Ostapczuk, P.; Stoeppler, M.; Diirbeck, H. W.: *Toxicol. Environ. Chem.* **27**, s. 49 (1990).
73. Hoenig, M.; Kersabiec, A-M.: *Spectrochimica Acta*. **57** Part B, s. 1297 (1996).
74. Krachler, M. a další.: *Anal. Chem.* **355**, s. 120 (1996).
75. Ellison, S. L. R.; Barwick, V. J.; Farrant T. J. D.: *Practical Statistics for the Analytical Scientist*. 2. vyd. Cambridge, RSC Publishing 2009.
76. Doc. RNDr. Barek, J. CSc. a další: *Metrologická terminologie v chemii*. Dostupné z URL: <http://www.vscht.cz/lam/new/barekterminologie2000_07_01.pdf> [Cit. 20. 2. 2013]
77. Armbruster, D. A.; Pry. T.: *Clin Biochem Rev.* **29**, s. 49-52 (2008).
78. Šimůnek, O.: *Chemiluminiscence*. Dostupné z URL: <chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf> [Cit. 20. 9 2012].
79. Ledvina, M.; Stoklasová, A.; Cerman, J.: *Biochemie pro studující medicíny*. 2. vyd. Praha, Karolinum 2009.